Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. W. Zimmermann

Untersuchungen über die Fällbarkeit von Enteroviruskomponenten mit Polyanionen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
HELMUT ABEL

1969

Dekan: Prof. Dr. med. H. Witter
Referent: Prof. Dr. med. R. Wigand

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. W. Zimmermann

Untersuchungen über die Fällbarkeit von Enteroviruskomponenten mit Polyanionen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
HELMUT ABEL
1969

Dekan: Prof. Dr. med. H. Witter
Referent: Prof. Dr. med. R. Wigand

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 6. Februar 1969 abgelegt .

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE FÄLLBARKEIT VON ENTEROVIRUSKOMPONENTEN MIT POLYANIONEN

EINLEITUNG

1. Enteroviren: Nach einer Klassifikation aus dem Jahre 1957, die in der Folgezeit wegen der Entdeckung neuer Virusstämme laufend ergänzt werden mußte, unterteilt man die Gruppe der Enteroviren wie folgt: (15, 16, 66, 74)
   a) Poliomyelitisviren: Typ I - III
   b) Coxsackieviren: aa) Gruppe A: Typ 1 - 24
      bb) Gruppe B: Typ 1 - 6
   c) Echoviren: Typ 1 - 33 - Echovirus Typ 10 zählt heute zu den Reoviren (86)

   Die ersten Stämme der Enteroviren mit Ausnahme der Polioviren wurden von DALLDORF et al. (17) aus Stuhlproben von Patienten isoliert, die an paralytischer Poliomyelitis erkrankt waren. Die Viren wurden später nach dem Dorf im Staate New York, in dem sie entdeckt worden waren, Coxsackieviren genannt. Die naheliegende Annahme, daß sie für die paralytischen Erkrankungen der Patienten aus Coxsackie verantwortlich gewesen wären, konnte jedoch bis heute nicht bestätigt werden. Rückblickend muß man annehmen, daß damals die auch zur Familie der Enteroviren gehörenden Poliomyelitis-Viren die Erreger der zu Lähmungen führenden Erkrankungen waren. Noch im gleichen Jahr gelang es den späteren Nobelpreisträgern ENDERS, WELLER und ROBBINS (20) erstmalig, den Poliovirusstamm Lansing in Zellkulturen aus embryonalem, menschlichem Gewebe zu züchten. Den Nachweis dafür erbrachten sie durch Beschreibung eines typischen cytopathogenen Effektes. Wenige Jahre später waren auch die übrigen Poliostämme aus Faeces von Patienten direkt isoliert und serologisch identifiziert, die an aparalytischer oder paralytischer Poliomyelitis erkrankt waren.

In der Folgezeit wurde eine Reihe weiterer Coxsackieviren entdeckt. Heute kennt man 30 verschiedene serologische Typen, bei einer Gesamtzahl von z.Zt. 65 Enteroviren, die aus menschlichem Rachenabstrich, Liquor oder Stuhl isoliert wurden.

Der von ENDERS et al. (20) eingeführten Gewebekulturtechnik verdankt auch die dritte Gruppe der Enteroviren ihre Entdeckung. Man fand im Rahmen der epidemiologischen Erforschung der Poliomyelitis eine ganze Reihe von Viren, die für Laboratoriumstiere apathogen waren (65, 82). Die bis dahin unbekannten Viren konnten in den Faeces gesunder Kinder wie auch von Patienten isoliert werden, die an abakterieller Meningitis erkrankt waren. Wegen der zunächst angenommenen Apathogenität für Mensch und Tier gab man ihnen erst den Namen "orphan viruses" (67) und später "enteric cytopathogenic human orphan viruses" oder abgekürzt Echo-Viren (14).

Unter den Enteroviren besitzen die Polioviren als Krankheitserreger die größte Bedeutung. Das klassische Krankheitsbild, das sie verursachen können, ist die paralytische Poliomyelitis mit verschiedenen klinischen Bildern.

Infektionen des Menschen durch die Gruppe der Coxsackieviren verlaufen übereinstimmend mit denen der übrigen Enteroviren oft asymptomatisch, wie Untersuchungen von Patienten zeigten, die mit Coxsackie-B 4-Virus infiziert worden waren. Zu den klinisch gut abgegrenzten Krankheitsbildern gehören die folgenden (27):

a) Abakterielle Meningitis: Sie kann durch sämtliche Coxsackieviren der Gruppe B sowie durch die Typen A 7 und A 9 hervorgerufen werden.
b) Epidemische Myalgie oder Bornholm'sche Krankheit: Sie wird vor allem durch die Typen 1 - 4 der Gruppe B, seltener durch Typ 5 verursacht.

c) Neugeborenenmyokarditis: Ätiologisch spielen hier die Typen 2 - 5 der Gruppe B eine Rolle.
d) Herpangina: Als Erreger werden einige Typen der Gruppe A angesehen (2, 4, 5, 6, 8 und 10).

Daneben können zahlreiche Coxsackieviren der Gruppe A und B, besonders aber der Typ A 21, unspezifische Erkrankungen des Respirationstraktes hervorrufen, wie Infektionsversuche bei Freiwilligen beweisen konnten. Die wahrscheinlich häufigsten Krankheitsformen, unter denen apparente Infektionen mit Coxsackieviren ablaufen, sind uncharakteristische fieberhafte Allgemeinerkrankungen mit stets gutartigem Ausgang (27). Besonders interessant sind die Beobachtungen von VOROSHILOVA und CHUMAKOV (116), die 1959 erstmals poliomyelitisähnliche Erkrankungen nach Infektionen mit Coxsackieviren vom Typ A 27 beschrieben. Ähnliche Fälle wurden von RANZENHOFER et al. (78) und von GRIST (25) in Schottland beobachtet.

Nachdem die Bedeutung der Echo-Viren als Krankheitserreger nach ihrer Entdeckung zunächst unklar war, konnten in der Folgezeit verschiedene Syndrome in einen ätiologischen Zusammenhang mit Echo-Viren gebracht werden, durch deren Isolierung im Rahmen größerer Epidemien (119). So wurde 1963 eine Meningitisepidemie beschrieben, während der aus dem Liquor der an aseptischer Hirnhautentzündung erkrankten Personen Echovirus Typ 7 isoliert werden konnte. Bei anderen Meningitisepidemien fand man die Echovirustypen 4, 6, 9 und16. Außerdem ergab sich ein ursächlicher Zusammenhang zwischen exanthematischen Erkrankungen, die z.T. mit Meningitis kombiniert waren und Echoviren. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte man bei der ätiologischen Klärung von Durchfallserkrankungen und respiratorischen Infekten (10, 19, 70, 77).

Wie schon der Name andeutet, zeichnen sich die Enteroviren dadurch aus, daß sie sich beim Menschen vor allem im

Intestinaltrakt ansiedeln und vermehren. Deshalb werden sie auch meist aus Stuhl, Rachenabstrich oder beidem isoliert (66). Daneben besitzen die Enteroviren folgende gemeinsame Eigenschaften (39):

a) Die Größe der Viruspartikel beträgt nach elektronenoptischen Messungen gereinigter Viruspräparate 28 m/u in annähernder Übereinstimmung mit Werten von 20 - 29 m/u, die bei Filtrationsversuchen ermittelt wurden (65). Mit Hilfe der Negativkontrasttechnik läßt sich elektronenoptisch zeigen, daß das einzelne Viruspartikel aus einem Innenkörper und einer umgebenden Hülle, dem Capsid, besteht. Das Capsid wiederum ist aus morphologischen Untereinheiten, den Cepsomeren, zusammengesetzt, die wahrscheinlich in Gestalt eines Ikosaeders von kubischer Symmetrie angeordnet sind (63).

b) Der Innenkörper besteht aus Ribonucleinsäure, als Trägerin der genetischen Information und Substrat der Infektiosität (66).

c) Die Enteroviren sind resistent gegen Äther, da ihre Hülle keine essentiellen Lipoide enthält.

d) Durch zweiwertige Kationen werden die Viren gegen Inaktivierung bei 50° C geschützt. Diese Eigenschaft wird bei der Herstellung von besonders haltbarer oraler Poliovakzine ausgenutzt (68).

e) Während des Wachstums in Zellkulturen verursachen die Enteroviren einen typisch cytopathogenen Effekt (CPE): Die Zellen runden sich ab, zeigen Kernpyknose und verlieren ihre glatte Oberfläche. In gefärbten Präparaten kann man eosinophile Massen vor allem im Zentrum der Zelle beobachten, die den geschrumpften Zellkern und das basophile Zytoplasma an die Zellperipherie verdrängt haben (3, 79). Elektronenmikroskopisch lassen sich in von Enteroviren befallenen Zellkulturen oder Geweben kristalline Strukturen darstellen, die aus dichten, etwa 17 - 28 m/u großen, sphärischen Partikeln bestehen (72, 80, 110). Die Echoviren Typ 22 und 23 verursachen in späten Infektionsstadien zytologische Veränderungen, die von denen der an-

deren Enteroviren etwas abweichen. Es kommt dabei zur Auflösung der Kernstruktur mit Anhäufung von Chromatingranula an der Kernmembran und zum Verschwinden der intrazellulären Strukturen (108).

Man kann die Enteroviren nach ihrer Fähigkeit, in verschiedenen Zellkulturen zu wachsen und nach dem dabei entstehenden zytophatogenen Effekt genauer differenzieren (s. auch Tab. I). Optimale Wachstumsbedingungen für Enteroviren bieten im allgemeinen Zellkulturen aus dem Epithel von Primaten. Polioviren wachsen am besten in Affennierenzellen, Hela-Zellen und menschlichen Amnionzellen. Ähnliches gilt für alle Coxsackieviren der Gruppe B. Von den Coxsackieviren der Gruppe A, deren Prototypen im allgemeinen nicht in Gewebekulturen wachsen, wächst der Typ A 9 gut in Affennierenzellen (66). Die meisten Viren der Gruppe A lassen sich an menschliche Amnionzellen adaptieren (119). Einige Coxsackieviren kann man unmittelbar aus menschlichen Zellkulturen isolieren. Coxsackievirus A 21 wächst sogar am besten in Hela-, Affennieren- und embryonalen Nierenzellkulturen vom Menschen. Erst nach wiederholten Gewebekulturpassagen wird das Virus pathogen für säugende Mäuse (113).

	Affennierenzellen	Hela- und andere Zellstämme vom Menschen	Pathogenität	
			säugende Mäuse	Affen
Polio	+	+	0	+
Coxsackie A	0	0 (+)	+	0
Coxsackie B	+	+	+	0
Echo	+	0	0	0

Tabelle I: Enteroviren: Wachstum in Affennieren- und Humanzellkulturen. Pathogenität für Tiere (nach MELNICK 1965).

Die Echoviren, die die dritte Untergruppe der Enteroviren bilden, wachsen gut in Affennierenzellen und in der Mehrzahl auch in menschlichen Amnionzellen unter Ausbildung eines typischen CPE (66). Im Gegensatz zu den übrigen Enteroviren, die in Nierengewebekulturen von M.rhesus und E.patas, in menschlichen Amnionzellen sowie in einer bestimmten Linie der sogenannten Hep-2-Zelle (Abkömmling eines menschlichen Epithelioms) einen CPE ausbilden, vermehren sich die Echoviren auf der Hep-2-Zelle überhaupt nicht und auf den anderen Geweben unterschiedlich (27).

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal für Enteroviren ergibt sich aus der unterschiedlichen Plaquebildung in Zellkulturen, die mit Agar überschichtet sind. Während Polioviren scharf begrente runde Plaques bilden, sind die Plaques der Coxsackie-B-Viren unscharf begrenzt und ausgedehnter, wobei die einzelnen Typen wieder unterschiedliche Plaques bilden. Coxsackieviren der Gruppe A, die in menschlichen Amnionzellen wachsen, zeigen Plaques von sehr wechselnder Gestalt (117). Unterschiede in der Plaquemorphologie sind auch bei den Echoviren zu beobachten und ermöglichen eine weitere Klassifizierung (35).

Im Neutralisationstest (N-Test), dessen Grundlage der cytopathogene Effekt bildet, zeigen eine Reihe von Enteroviren das 'break-through'-Phänomen (122). Bei Verwendung von Primärstämmen statt Prototypstämmen ergeben sich bei früher Ablesung hohe und gut reproduzierbare Titer im N-Test, während bei später Ablesung niedrige Titer auftreten.

Wie Tabelle I unter anderem summarisch zeigt, bildet die unterschiedliche Pathogenität für Tiere ein weiteres Kriterium zur Differenzierung der Enteroviren. Poliovirusinfekte führen bei Affen zu schlaffen Lähmungen im Gegensatz zu den Coxsackie-Virus-Infekten, die mit Ausnahme der Typ A 7-Infektion bei Affen apathogen verlaufen. Das

Coxsackie-A7-Virus ruft nach intrazerebraler Injektion beim Rhesusaffen ebenfalls schwere schlaffe Lähmungen hervor, weshalb es von sowjetischen Forschern auch als Poliovirus Typ IV eingestuft wurde (116).

Die Einteilung der Coxsackieviren in die Gruppen A und B beruht auf unterschiedlichen pathologischen Veränderungen, die sie in neugeborenen Mäusen hervorrufen können. Die Viren der Gruppe A verursachen eine generalisierte Myositis ohne Befall des Herzmuskels, die von einer schlaffen Lähmung begleitet wird. Hingegen rufen Viren der Gruppe B eine fokale Myositis mit Läsionen im interscapulären Fettpolster und im Gehirn hervor. Bei einjährigen Mäusen fand man experimentell nach Coxsackievirus-A-Infektionen nur eine Myokarditis ohne Skelett-Muskel-Befall. Demnach spielt das Alter eine gewisse Rolle in der Empfänglichkeit des Herzmuskels für Viren (55).

Keiner der ursprünglichen Stämme der Echoviren ruft in Laboratoriumstieren apparente Krankheiten hervor, jedoch führt die intrazerebrale oder intraspinale Injektion einiger Stämme bei Affen zur Zerstörung von Nervenzellen, die mit Fieber, Virämie und gelegentlich auch Paralyse einhergehen (119). Orale, intramuskuläre und intrakutane Applikation von Echoviren führt bei Schimpansen zu inapparenten Infektionen mit Antikörperbildung und Virusausscheidung in den Faeces (40).

2. Komplementbindungsreaktion bei Enterovirus-Infektionen

Zur serologischen Diagnose von Enterovirusinfektionen wird neben der Neutralisations-Reaktion und dem Präzipitationstest seit längerer Zeit auch die Komplementbindungs-Reaktion benutzt.

Von Anfang an stieß man bei der breiteren Anwendung der KBR gehäuft auf Ergebnisse, die im Widerspruch zu den üb-

rigen Befunden z.B. bei Polioinfekten standen und beträchtliche Verwirrung stifteten (61, 67, 88, 111, 112). SVEDMYR et al. (112) nahmen an, daß die Anwesenheit mehrerer Antigene in dem benutzten infektiösen Gewebekulturüberstand für die widersprüchlichen Resultate der diagnostischen KBR verantwortlich sei. Diese Hypothese wurde in den folgenden Jahren durch eine Reihe von Autoren bestätigt, die Poliorohantigen zunächst mit biochemischen Methoden behandelten und das so entstandene Produkt einer Ultrazentrifugierung im Dichtegradienten unterzogen (49, 50, 60, 62, 84, 85, 87, 88, 89, 106, 107). Danach ließen sich zwei verschiedene, antigene Viruskomponenten trennen, die sich sowohl biochemisch als auch serologisch und bezüglich Sedimentationskonstante und Infektiosität unterscheiden. Sie wurden in den Fraktionen C bzw. D isoliert und von der Arbeitsgruppe um HUMMELER (37, 38) als H- (= heated) und N- (= native) Antigen bezeichnet, da sich nach elektronenoptischen Untersuchungen D durch Erhitzen in C umwandeln ließ. Die N-Komponente besteht aus infektiösen und nichtinfektiösen intakten Viruspartikeln, die aus RNS-Innenkörper und Proteinhülle bestehen und eine Sedimentationskonstante von 160 S besitzen. Die H-Komponente stellt die Proteinaußenschicht des Poliovirus dar, besizt eine Sedimentationskonstante von 80 - 90 S und ist nicht infektiös. HINUMA et al. (34) konnten zeigen, daß zwischen Antigenumwandlung und Freisetzung von RNS aus dem kompletten Virus ein Zusammenhang besteht.

In Analogie zu den beiden Virusantigenen konnte man sowohl im menschlichen Serum nach Infektion als auch im Tierserum nach experimenteller Immunisierung zwei differente Antikörper nachweisen, die sich in ihrem zeitlichen Auftreten beim Menschen unterscheiden (37, 38, 50, 83, 101). Vor allem mit Seren von akut an Poliomyelitis Erkrankten reagieren die H-Antigene, während die N-Antigene vorwiegend mit Rekonvaleszentserum reagieren. Die N-Antigene

lassen sich durch Erhitzen (85), Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (85) und Formalinbehandlung (101) in Komponenten mit der serologischen Spezifität des H-Antigens umwandeln. Der Wirkungsmechanismus der UV-Bestrahlung besteht in einer Freisetzung der RNS aus den kompletten Viren (46).

Mit Coxsackieviren wurden später ähnliche Untersuchungen mit im wesentlichen gleichen Ergebnissen durchgeführt (22, 95).

SCHMIDT (103) konnte zeigen, daß die unterschiedlichen und teilweise widerspruchsvollen Ergebnisse bei der Untersuchung komplementbindender Polioantikörper vor allem auf die verschiedenen Gewinnungs- und Aufbereitungsverfahren zurückzuführen sind, da es je nach Methode zu einer unterschiedlichen Konzentration der serologisch verschieden reagierenden N- und H-Komponenten kommt. So verwendete ein Teil der Untersucher natives Rohantigen in der KBR (44, 48, 53, 54, 89, 90, 92), während der andere das Rohantigen vorher mit fluorierten Kohlenwasserstoffen behandelten (31, 33, 36, 89). Außerdem wurde mit erhitzten (4, 5, 7, 8, 9, 30, 48, 68, 89, 111, 112), mit Formalin (9) und ultraviolettem Licht (48) behandelten und nach verschiedenen anderen Verfahren konzentrierten Rohantigenen (4, 8, 9, 30, 67, 92, 111, 112) in der diagnostischen KBR gearbeitet. Eine Reihe von Autoren, die Polio-Rohantigene, d.h. N/H-Mischantigene verwendeten, stellten das Auftreten unspezifischer Reaktionen fest (44, 51, 52, 53, 57, 91). Reine H-Antigene, die durch Erhitzen gewonnen wurden, erwiesen sich wegen ihrer unspezifischen und heterologen Verhaltensweise ebenfalls für die diagnostische KBR als unbrauchbar (4, 5, 7, 18, 24, 30, 32, 33, 48, 64, 68, 89, 111, 112, 124). Ausgezeichnete Ergebnisse in der diagnostischen KBR brachten dagegen die N-Antigene aus der Gewebekultur. Unspezifische Reaktionen traten überhaupt nicht auf (97, 102, 103).

In der diagnostischen KBR für Coxsackie- und Echovirusinfektionen verwendete man fast ausschließlich erhitzte (30, 71, 124) und native Rohantigene (6, 11, 29, 41, 42, 43, 47, 54, 69, 81, 93, 94, 120). Die dabei erzielten Ergebnisse waren durchweg unbefriedigend, da heterologe und unspezifische Reaktionen auftraten. POLZIN et al. (in Vorbereitung), die kürzlich serologisch geprüfte N-Antigene und Mischantigene (N+H) auf ihre Eignung in der diagnostischen KBR untersuchten, erzielten nur mit ersteren gute Resultate.

3. Konzentration und Reinigung von Enteroviren: Die gebräuchlichen Methoden zur Konzentration und z.T. auch zur Reinigung von Enterovirusantigenen lassen sich grob in Einschritt- und Mehrschrittverfahren aufteilen (99). Zu den ersten zählen vor allem die Fällungsverfahren durch Zusatz von Schwermetallsalzen (26, 109, 118, 123), Nucleinsäure (13), Aluminiumphosphat (21), Natriumphytat (114), Polyphosphorsäure (99, 102, 105) und Tannin (102), wobei zu erwähnen ist, daß mit den beiden letzten Fällungsmitteln gleichzeitig eine Konzentration und Reinigung erzielt werden konnte. Weitere einfache Methoden sind "Pervaporation durch Aspiration", die allerdings nur zur Konzentration führt (2), Dialyse gegen Polyvinylpyrrolidin (1) und Fällung durch Entsalzung mittels Schlauchdialyse oder Mischbett-Ionenaustauscher (97, 99).

Die Mehrschrittverfahren umfassen im allgemeinen neben ein- bis mehrmaliger Fällung Verfahren wie Ultrazentrifugation, Butanolextraktion, Fermentbehandlung und schließlich Elektrophorese oder Sedimentation im Dichtegradienten (12, 45, 59, 107). Abweichend davon liegen dem Verfahren von POLSON und HAMPTON (75) Pervaporation-Dialyse-Zyklen zugrunde. Unter den aufgeführten Methoden bieten die einfachen Fällungsverfahren durch Entsalzung oder Zusatz von Polyphosphorsäure (97, 99, 102, 105) abgesehen von dem guten Reinigungs- und Konzentrationseffekt, aus Gründen

der schnellen Durchführbarkeit, der Schonung der Viren und der großen Ausbeute an reinem, komplettem Virusantigen (N-Komponente) besonders in der Praxis deutliche Vorteile.

Nach den Untersuchungen von SCHMIDT (96, 98) sind die Ergebnisse der diagnostischen Enterovirus-KBR nur bei Verwendung der N-Komponente als Antigen zuverlässig. Die Voraussetzung für einen routinemäßigen Gebrauch der N-Komponente in der KBR ist jedoch eine gute und schnelle Gewinnungsmethode, damit das Antigen in ausreichender Menge zur Verfügung steht. Da das bisher angewendete Verfahren zur Trennung der antigenen Komponenten durch Ultrazentrifugation im Dichtegradienten umständlich und zeitraubend ist, suchten wir nach einer einfachen und schnellen Methode. Die fraktionierte Ausfällung von Antigenen nach SCHMIDT (102, 105), die bei Polioviren erfolgreich war, schien uns einer versuchsweisen Anwendung bei Coxsackieviren wert. Gleichzeitig wollten wir die Eignung mehrerer Polyphosphate als Fällungsmittel prüfen.

FRAGESTELLUNG

Es soll im folgenden die Möglichkeit einer fraktionierten Präzipitation von Coxsackieviren mit Polyanionen untersucht werden. Die Versuche werden mit den Typen 4 und 5 der Coxsackieviren der Gruppe B durchgeführt.

Als Fällungsmittel dienen Polyphosphorsäure, drei weitere Polyphosphate sowie Nukleinsäure.

Überstand und Sediment der Fällungsfraktionen werden jeweils auf ihren Proteingehalt untersucht. Außerdem wird mit der Komplementbindungsreaktion der Gehalt an Virusantigenkomponenten ermittelt.

MATERIAL UND METHODE

1. Virus und Virusvermehrung

Als Untersuchungsmaterial dienten Coxsackieviren vom Typ B 4 und B 5. Die Vermehrung der Viren erfolgte in MS-Zellen (= permanenter Zellstamm von Affennieren). HANKS-sche Lösung mit Zusatz von 10 % inaktiviertem Kälberserum, 0.5 % Caseinhydrolysat, 200 E Penicillin-G und 200 γ Streptomycin/ml Nährlösung diente als Wachstumsmedium. Nachdem sich Zellrasen in 4-l-Penicillinkolben gut ausgebreitet hatten, wurden nach Entfernung des Wachstumsmediums 100 ml Erhaltungsmedium (= Wachstumsmedium ohne Kälberserum) zugefügt. Die Inkubation der beimpften Zellkulturen wurde bei 37° C bis zum Sichtbarwerden des vollständigen cytopathogenen Effektes (CPE) durchgeführt. Danach wurden die Zellrasen mit dem Erhaltungsmedium bei ./. 20° C eingefroren, aufgetaut, abgefüllt und bei ./. 20° C aufbewahrt (=Rohantigen).

2. Fällungsmittel

Zur fraktionierten Fällung dienten folgende Fällungsmittel:

a) Die Polyphosphorsäure (techn.) der Fa. Fluka AG, Mol.-Gew. ~ 340, mit ~ 60 % $H_5P_3O_{10}$ + ~ 15 % $H_4P_2O_7$ + ~ 10 % $(HPO_3)_6$ + ~ 15 % $(HPO_3)_x$

b) Natriumtrimetaphosphat ($Na_3P_3O_8$) der Fa. Joh.A. Benckiser GmbH

c) Pentanatriumtriphosphat ($Na_5P_3O_{10}$) der gleichen Firma mit einem Durchschnitts-Kondensationsgrad von n = 7.

d) Nonanatriumheptaphosphat ($Na_9P_7O_{22}$) der gleichen Firma mit einem Durchschnitts-Kondensationsgrad von n = 7.

e) Nucleinsäure der Firma Roth, Hefen-Ribonucleinsäure pur F 228-230

3. Salzlösungen

a) Veronalpuffer zur KBR: OSLER et al (73)

Lösung A:
0.2 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, 1.0 g $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ und 4.6 g 5.5-Diäthyl-barbitursäure werden zusammen mit Gelatine in 500 ml Aqua bidestillata kurz aufgekocht.

Lösung B:
2.52 g $NaHCO_3$ + 83.80 g NaCl werden mit 3.0 g 5.5-Natriumdiäthylbarbiturat in 500 ml kaltem Aqua bidestillata gelöst.

Stammpuffer:
Lösung A und Lösung B werden zusammengegeben und auf 1000 ml aufgefüllt. Zum Gebrauch wird die Stammlösung 10-fach verdünnt. Der pH-Wert liegt jetzt zwischen 7.2 und 7.4

b) Phosphat-Lösungen zur Aufnahme des Sedimentes

I) 0.04 m Na_2HPO_4 + 0.2 m NaCl
II) 0.02 m Phosphatpuffer (pH 7.1) + 0.1 m NaCl

4. Durchführung der Fällung: Die Rohantigenmenge, die für eine Versuchsreihe erforderlich war, wurde durch Zentrifugieren (10' 2000 g) vom Zelldetritus befreit. Danach wurde das Antigen in gekühltem Zustand in 5-ml-Portionen aufgeteilt, die im Eisbad unter pH-Kontrolle (Glaselektrode 78087 V für Kältemessungen mit Kalomel-Fiberelektrode 39170 am Beckman pH-Meter, Mod. H-2) mit dem jeweiligen Fällungsmittel versetzt wurden. Die für 5 ml Antigen vorgesehene Fällungsmittelmenge befand sich in 0.20 ml Aqua dest. gelöst, mit Ausnahme der Nukleinsäure, die in 0.20 ml n/10 NaOH gelöst wurde. Nach Zugabe des Fällungsmittels wurde der gewünschte pH-Wert sofort mit 1 n bis n/10 HCl oder NaOH eingestellt.

Die Fraktionen wurden mindestens 30 min. bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt und anschließend 10 min. bei 2000 g zentrifugiert. Hierauf wurde der Überstand abgetrennt, auf neutrale Werte gebracht und das Sediment mit 1 ml Phosphatlösung I eingefroren. Nach dem Auftauen ließ sich das Sediment leicht lösen und wurde mit Pufferlösung II auf 2.5 ml aufgefüllt.

5. Eiweißbestimmung: Zur Bestimmung des Proteingehaltes von Sediment und Überstand der einzelnen Fällungsfraktionen wurde die Methode nach LOWRY et al. (58) angewandt. Das im Überstand befindliche, aus der Gewebekulturflüssigkeit stammende Phenolrot mußte vorher beseitigt werden, um eine Verfälschung der Extinktionswerte bei der Kolorimetrie zu vermeiden. Dazu wurde je 1 ml Überstand der einzelnen Fraktionen mit der gleichen Menge 20 %iger Trichloressigsäure versetzt. Nach 10minütigem Stehenlassen mit gelegentlichem Schütteln wurden die Lösungen 10 min. bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetrennt und das Sediment mit 2 ml Äthanollösung in 0.1 m Kalium-Azetat versetzt. Dann wurde nach 10minütigem Stehenlassen mit gelegentlichem Umschütteln wiederum 10 min. bei 2000 g zentrifugiert. Nach Abguß des Überstandes wurde das Sediment in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Bei der anschließenden Eiweißbestimmung wurden folgende Lösungen verwendet (58):

Lösung A:
b 1: 1 %ige Lösung von $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ in Aqua destillata
b 2: 2 %ige Lösung von Natriumtartrat ($\cdot 2\ H_2O$) in Aqua destillata

Lösung B:
Durch Mischung von b_1 und b_2 entsteht Lösung B. Sie ist nur 1 Tag haltbar.

Lösung C:
100 ml der Lösung A werden auf Zimmertemperatur erwärmt und mit 2 ml Lösung B versetzt. Die dadurch entstehende Lösung C muß vor jedem Versuch frisch zubereitet werden.

Lösung D:
Ein Teil Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagens wird mit 0,96 Teilen 1 n NaOH verdünnt.

Ausführung der Bestimmung: 1 ml der Überstandsfraktionen, die durch Trichloressigsäurefällung von Phenolrot befreit worden waren, wurden mit 5 ml Lösung C versetzt. Nach 10 min. wurden 0.5 ml Lösung D zugefügt und sofort durch Schütteln gemischt. Nach mindestens 30 min. wurde die Extinktion im Elektrophotometer Elko 2 gemessen. Das Filter S 72 mit maximaler Durchlässigkeit bei der Wellenlänge 0.741 mμ wurde benutzt. Von den Sedimentfraktionen wurden 0.5 ml mit 0.5 ml Aqua dest. verdünnt. Die übrige Behandlung war die gleiche wie bei den Überstandfraktionen.

6. Herstellung der Immunseren für die KBR: Meerschweinchen (Gew. 400 - 500 g) wurden dreimal in Abständen von einer Woche mit je 3 ml Coxsackievirusantigen geimpft, das zur Entfernung der Zellproteine zweimal mit Frigen 113 behandelt wurde. 2 ml Antigen wurden intraperitoneal, je 0.5 ml intramuskulär in die Hinterläufe injiziert. 3 - 4 Wochen nach der letzten Injektion wurde nochmals die gleiche Dosis Antigen in gleicher Weise appliziert. 10 Tage später wurde Blut durch Herzpunktion gewonnen. Das Serum wurde durch Zentrifugation abgetrennt, durch 30 min. langes Erhitzen auf 56° C inaktiviert und bei ./. 20° C im Kühlschrank aufbewahrt. Gewonnen wurden nach dieser Methode Mischantiseren, die Antikörper sowohl gegen die N-Komponente wie auch gegen die H-Komponente enthielten.

Zur Gewinnung reiner H-Antiseren wurden Meerschweinchen nach obigem Verfahren mit Frigen behandeltem und 10 min auf 60° C erhitztem Rohantigen immunisiert.

MS-Zellantiseren wurden wie folgt gewonnen: Zunächst wurden gut ausgebildete MS-Zellrasen in Penicillinkolben mit physiologischer NaCl-Lösung zweimal gewaschen und dann durch Gefrieren und Wiederauftauen die Zellen in 50 ml NaCl-Lösung aufgeschwemmt, während 2 min. im Eisbad mit dem Ultra-Turrax homogenisiert, 10 min. bei 1400 g zentrifugiert und der Überstand bei 20° C eingefroren. Mit dem Überstand als MS-Zellantigen wurden Meerschweinchen in gleicher Weise wie oben immunisiert.

7. Komplementbindungs-Reaktion: In Überstand und Sediment jeder Fällungsstufe wurde mit Hilfe der KBR die H-Komponente (H-Antiserum), die Summe der N- und H-Komponenten (N/H-Antiserum) sowie das MS-Zellantigen (MS-Antiserum) ermittelt. Angewendet wurde die Mikromethode von FULTON und DUMBELL (23). Konstant waren dabei die Serummengen, während die Komplementmengen in einer Verdünnungsreihe um den Faktor 1.6 (logarithmisch: 0.2) anstiegen.

Mit einer Tropfpipette, deren Tropfengröße auf 0.02 ml eingestellt war, wurden Antigen und Antikörper sowie die verschiedenen Komplementverdünnungen in die Vertiefungen von Plexiglasplatten zusammengegeben. Als Komplement diente Meerschweinchenserum, das bei ./. 70° C gelagert wurde.

Überstand und Sedimentfraktionen lieferten die Antigene für die KBR. Da die Überstandfraktionen das doppelte Volumen der Sedimentfraktionen hatten, wurden in die entsprechenden Vertiefungen der Plexiglasplatten von den Erstgenannten zwei Tropfen gegenüber einem Tropfen Sedimentlösung eingebracht.

Als Antikörper dienten die spezifischen Meerschweinchen-Hyperimmunseren und das MS-Zellantiserum in der für die KBR günstigsten Gebrauchsverdünnung. Das Gemisch von Antigen, Antikörper und Komplement wurde zur Kälteinkubation über Nacht bei 4° C im Kühlschrank gelagert. Dann wurde das hämolytische System zugegeben, das folgendermaßen hergestellt wurde:

o.5 ml einer 10 %igen Hammelblutkörperchen-Aufschwemmung (dreimal in Veronalpuffer gewaschen) wurden mit 0.5 ml 1 : 100 vorverdünntem Ambozeptor (Behringwerke, Marburg) und 9 ml Veronalpuffer versetzt und 10 min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Hierauf wurde in jede Vertiefung der Plexiglasplatten mit der oben erwähnten Pipette ein Tropfen hämolytischen Systems gegeben und durch Beklopfen der Plattenränder vorsichtig gemischt. Zur Verhinderung der Austrocknung wurden je 3 Platten in feuchte Tücher gehüllt, ehe sie 90 - 120 Min. bei 37° C im Brutschrank inkubiert wurden. Die Ablesung der Reaktion erfolgte durch Schätzen der 50 %igen Hämolyse.

Zur Berechnung der gebundenen Komplementeinheiten T wurde die Formel

$$T = \frac{(SA) - (S) - (A) + (K)}{(K)}$$

angewendet (121).

(SA) = die für die 50 %ige Hämolyse benötigte Komplementmenge bei Anwesenheit von Antigen und Antikörper
(S) = bei Anwesenheit von Antiseren allein,
(A) = bei Anwesenheit von Antigen und 1 : 50 verdünntem Komplement und
(K) = bei Anwesenheit von 1 : 50 verdünntem Komplement allein.

Bei der Berechnung wurden die logarithmischen Werte dividiert und das Endergebnis auch logarithmisch angegeben. log T = 0 bedeutet, daß eine Komplementeinheit gebunden worden ist.

8. Bestimmung der pH-Empfindlichkeit der Coxsackievirus-Antigenkomponenten: Es wurde die gleiche Technik wie bei den vorhergehenden Fällungsversuchen unter Weglassen der letzten Zentrifugation zur Trennung von Überstand und Sediment angewandt. Außerdem wurde der Kühlschrankaufenthalt der pH-Fraktionen auf 1 h verlängert.

Folgende Fällungsmittel wurden vor Einstellung der pH-Werte zugegeben:

a) Polyphosphorsäure,
b) Nonanatriumheptaphosphat,
c) Nukleinsäure.

Nach Neutralisation, Einfrieren und Wiederauftauen der Fraktionen wurde mit Hilfe der KBR der H-Antigengehalt sowie die Gesamtheit der N- und H-Komponenten ermittelt.

ERGEBNISSE

A) FÄLLUNG MIT POLYPHOSPHORSÄURE

I. Coxsackievirus B 4

1. Virusantigen und MS-Zellantigen: In der ersten Versuchsreihe wurde mit einer Polyphosphorsäurekonzentration von 2.0 mg/ml Antigen gearbeitet und die Abhängigkeit der Fällung von der Wasserstoffionenkonzentration bestimmt. Der Untersuchungsbereich erstreckte sich von pH 2.6 bis pH 5.4 mit Fällungsstufen im Intervall von 0.2 pH. Abb. 1 zeigt die mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion (KBR) ermittelten Titer von N-Antigen, N/H-Gesamtantigen und MS-Antigen in Überstand und Sediment jeder Fällungsstufe.

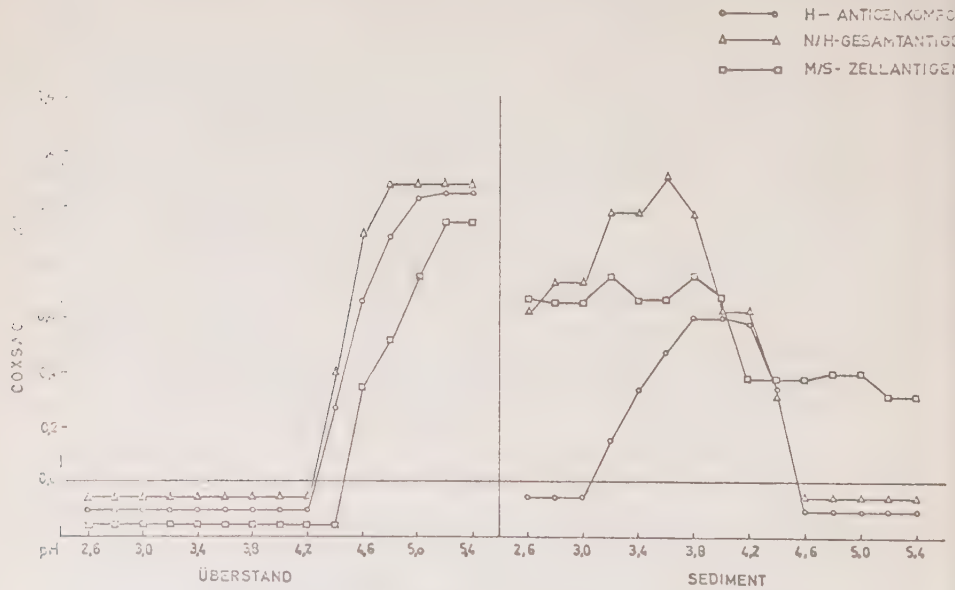

ABB. 1: PRÄZIPITATION DER COXSACKIE - B4 - ANTIGENKOMPONENTEN UND DES MS-ZELLANTIGENS MIT 2,0 mg POLYPHOSPHORSÄURE / ml ANTIGEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH - WERT.

Auf der Ordinate sind die gebundenen Komplementeinheiten, auf der Abszisse die pH-Werte der Fällungsstufen aufgetragen. Es zeigte sich, daß die einzelnen Antigenkomponenten unterschiedlich ausgefällt wurden. Das MS-Zellantigen zeigte den breitesten Fällungsbereich. Schon ab pH 5.4 war es - allerdings mit niedrigem Titer - im Sediment nachzuweisen. Zwischen pH 3.8 und pH 2.6 war es in annähernd konstanter Höhe vorhanden, allerdings nicht in gleicher Höhe wie im Überstand zwischen pH 5.2 und pH 5.4. Die Präzipitation war ab pH 4.0 mit zunehmender Wasserstoffionenkonzentration vollständig. Die H-Komponente fiel zwischen pH 3.2 und pH 4.4 aus, wobei bei pH 3.8 bis pH 4.2 das Maximum der Fällung lag. Ab pH 4.4 ließ sich die H-Komponente im Überstand nachweisen. Das N/H-Gesamtantigen konnte im Bereich zwischen pH 2.6 und 4.4 im Sediment erfaßt werden, während es im Überstand entsprechend ab pH 4.4 erschien.

Das Coxsackiegesamtantigen und die H-Komponente wurden also zwischen pH 4.2 und pH 3.2 vollständig ausgefällt. Da die H-Komponente unterhalb pH 3.2 in Sediment und Überstand nicht nachzuweisen war, das Gesamtantigen mit reduzierter Titerhöhe jedoch vollständig ausgefällt wurde, konnte es sich dabei nur um die N-Komponente handeln, die in der KBR mit dem N/H-Antiserum mit erfaßt wurde.

Gleichartige Fällungsversuche wurden mit einer Polyphosphorsäurekonzentration von 0.5 mg/ml Antigen durchgeführt. Wie Abb. 2 zeigt, wurde dabei der Fällungsbereich des MS-Zellantigens schmäler als oben.

(Abbildung s. nächste Seite)

Die H-Komponente zeigte bezüglich Verschiebung der Fällung in stärker saurem Bereich ähnliches Verhalten wie das MS-Antigen. Erst ab pH 4.0 war es in geringem Maße im Sediment nachweisbar. Bei pH 3.0 war es aus dem Sediment verschwunden. Im übrigen zeigte die H-Komponente den engsten

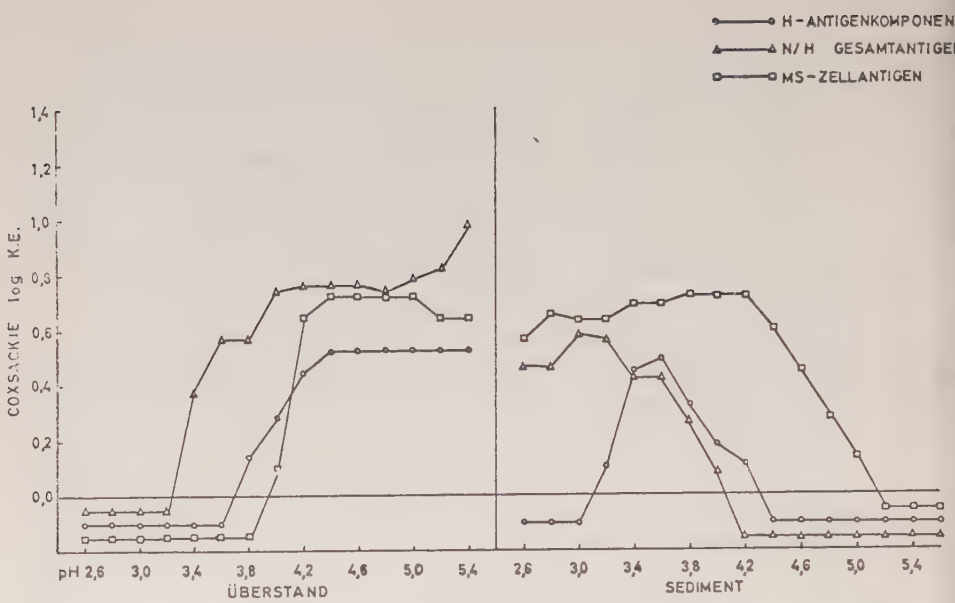

ABB. 2: PRÄZIPITATION DER COXSACKIE - B4 - ANTIGENKOMPONENTEN UND DES MS-ZELLANTIGENS MIT 0,5 mg POLYPHOSPHORSÄURE / ml ANTIGEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH-WERT.

Fällungsbereich. Nach Abzug der H-Antigentiter ergeben sich die Titerhöhen des N-Antigens in Überstand und Sediment. Das N-Antigen wird im pH-Bereich unter pH 3.2 bis pH 2.6 im Gegensatz zum H-Antigen vollständig ausgefällt.

2. Gesamtprotein: Das Nach der Methode von LOWRY et al. in Überstand und Sediment jeder Fällungsfraktion bestimmte Gesamtprotein war abhängig von der Höhe der Polyphosphorsäure-Konzentration. Während nach Zusatz von 0.5 mg Polyphosphorsäure/ml Antigen das gesamte Protein nur zwischen pH 2.6 und pH 3.4 im Sediment vorlag, wurde das Gesamtprotein nach Zugabe von 2.0 mg Polyphosphorsäure zwischen pH 2.6 und 3.8 ausgefällt. Der Bereich der Proteinfällung verschob sich also mit zunehmender Phosphatkonzentration ins Alkalische (siehe Abb. 3)

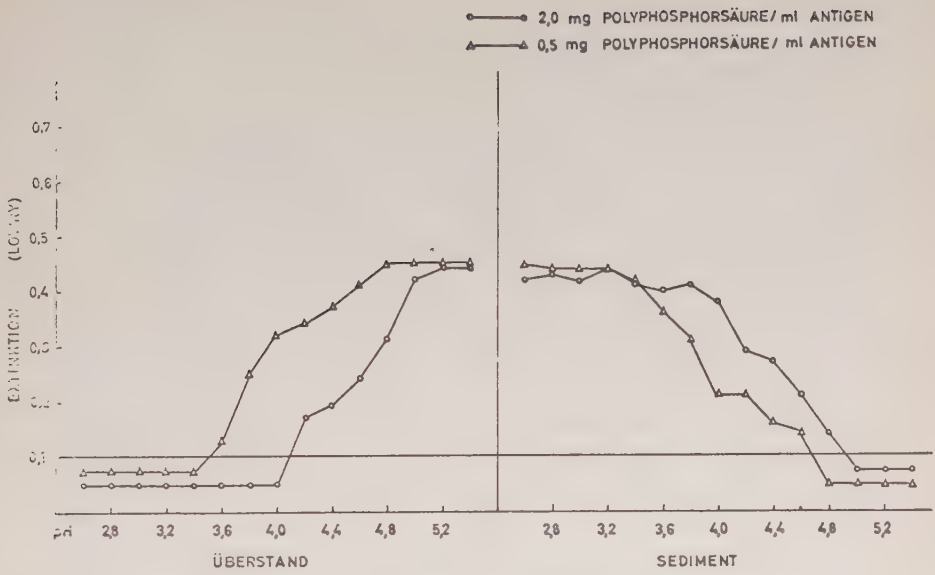

ABB. 3 : PRÄZIPITATION DES GESAMTPROTEINS MIT HILFE UNTERSCHIEDLICHER POLYPHOSPHORSÄUREMENGEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH-WERT.

II. Coxsackievirus B 5

1. Virusantigen und MS-Zellantigen: Die fraktionierten Fällungsversuche wurden in gleicher Weise wie bei Coxsackievirus B 4 mit einem Polyphosphorsäurezusatz von 2.0 und 0.5 mg/ml Antigen durchgeführt. Aus Abb. 4 geht hervor, daß das MS-Zellantigen wiederum den breitesten Fällungsbereich besitzt. Die H-Komponente wurde zwischen pH 3.0 und 3.8 vollständig ausgefällt, die N-Komponente jedoch schon ab pH 4.2.

(Abbildung s. nächste Seite)

Die Ergebnisse der Fällungsversuche mit der niedrigeren Polyphosphorsäurekonzentration zeigt Abb. 5. Sämtliche Fällungsbereiche verschoben sich in eine Zone stärkerer

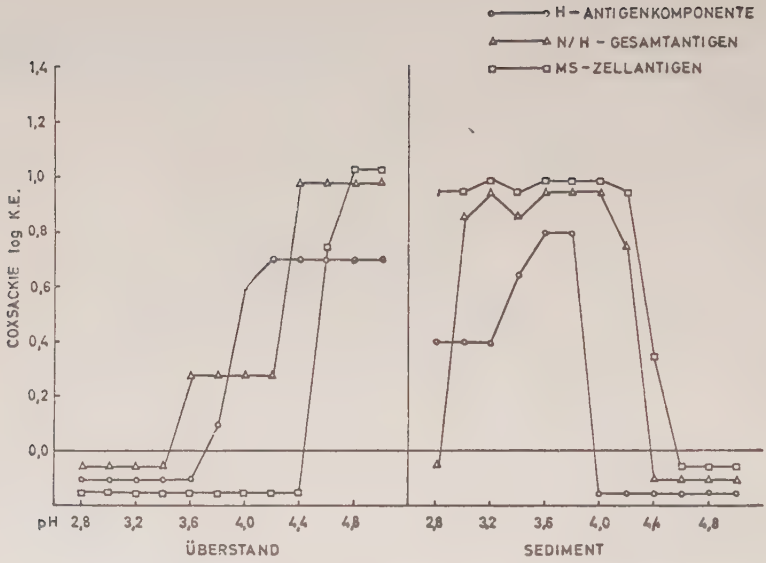

ABB. 4 : PRÄZIPITATION DE COXSACKIE – B 5 – ANTIGENKOMPONENTEN UND DES MS – ZELLANTIGENS MIT 2,0 mg POLYPHOSPHORSÄURE / ml ANTIGEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH – WERT.

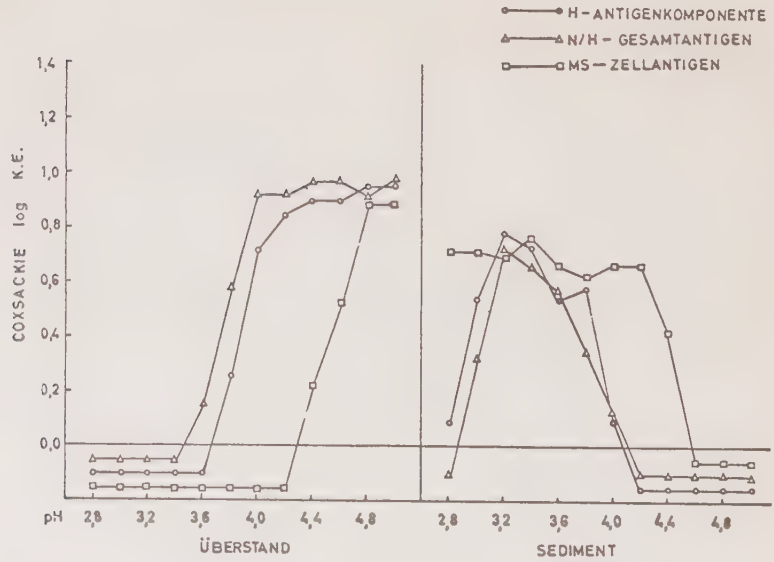

ABB. 5 : PRÄZIPITATION DER COXSACKIE – B 5 – ANTIGENKOMPONENTEN UND DES MS – ZELLANTIGENS MIT 0,5 mg POLYPHOSPHORSÄURE / ml ANTIGEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH – WERT.

sich um etwa pH 0.4 in das saure Milieu. Die gleiche Verschiebung konnte bei der Fällung der H-Komponente beobachtet werden. Unterhalb pH 3.4 wurde die H-Komponente zerstört. Oberhalb pH 4.0 wurde sie nicht ausgefällt. Die N-Komponente erschien ab pH 4.0 im Sediment und ließ sich ab pH 3.0 nur noch dort nachweisen. Also fand auch hier eine Verschiebung in den Bereich niedrigerer pH-Werte statt.

2. Gesamtprotein: Der Proteingehalt in Überstand und Sediment jeder Fraktion wurde nach der Methode von LOWRY et al. (58) bestimmt (Abb. 8). Hierbei konnte wie beim Fällungsversuch mit Polyphosphorsäure eine Verschiebung der Ausfällung ins Alkalische mit zunehmender Konzentration des Fällungsmittels festgestellt werden. Sie betrug 0.6 pH gegenüber 0.4 pH bei der Polyphosphorsäurefällung.

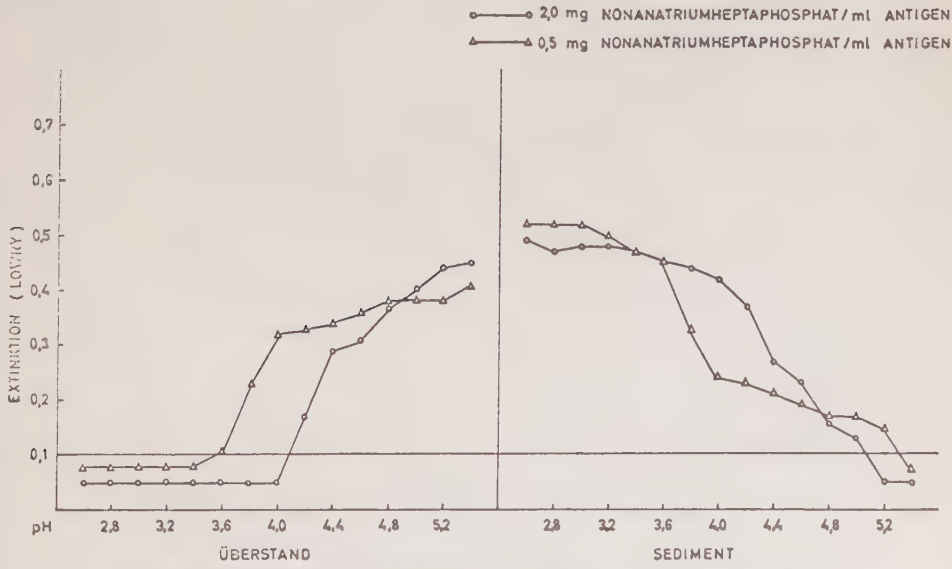

ABB. 8: PRÄZIPITATION DES GESAMTPROTEINS MIT HILFE UNTERSCHIEDLICHER NONANATRIUM-HEPTAPHOSPHATMENGEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH-WERT.

II. Coxsackievirus B 5

Verhalten von Virusantigen und MS-Zellantigen (s. Abb. 9):

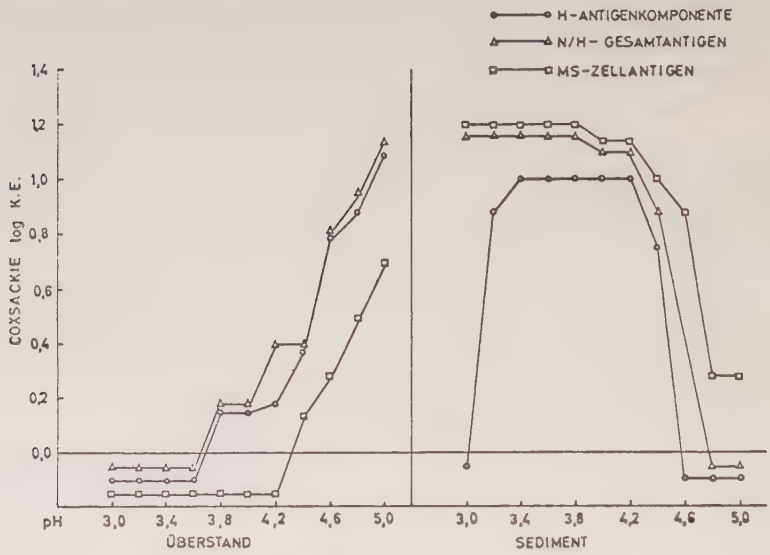

ABB.9 : PRÄZIPITATION DER COXSACKIE-B5-ANTIGENKOMPONENTEN UND DES MS-ZELLANTIGENS MIT 2,0 mg NONANATRIUMHEPTAPHOSPHAT/ml ANTIGEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH-WERT.

Bei einer Konzentration des Fällungsmittels von 2.0 mg/ml Antigen erstreckte sich der Fällungsbereich des MS-Zellantigens über den gesamten untersuchten pH-Bereich. Die H-Komponente erschien ab pH 4.4 im Sediment und war bis pH 3.2 nachzuweisen; unterhalb pH 3.2 war sie aus Sediment und Überstand verschwunden. Die N-Komponente war hingegen noch bei einem pH-Wert von 3.0 in voller Titerhöhe nachweisbar (dem niedrigsten Wert des untersuchten Bereiches). Die N-Komponente erschien bei einem um 0.2 höheren pH-Wert im Sediment als die H-Komponente.

Der Zusatz von 0.5 mg Nona-Na-heptaphosphat/ml Antigen hatte

nur geringe Änderungen des Fällungsmusters zur Folge. Der Fällungsbereich des MS-Zellantigens verschmälerte sich um etwa 0.2 pH-Stufen. Die N-Antigenkomponente verschwand später aus dem Überstand. In der Fraktion mit dem pH-Wert 3.0 war nur die N-Komponente neben dem MS-Zellantigen vorhanden (Abb. 10).

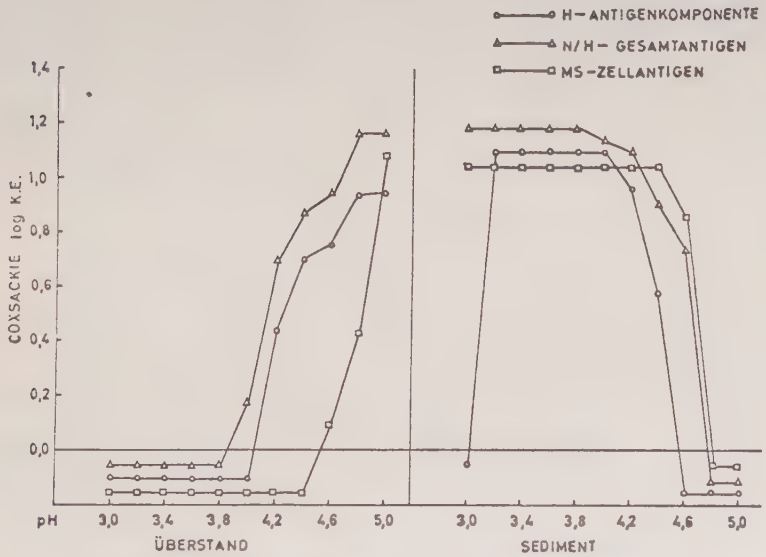

ABB. 10: PRÄZIPITATION DER COXSACKIE-B5-ANTIGENKOMPONENTEN UND DES MS-ZELLANTIGENS MIT 0,5 mg NONANATRIUMHEPTAPHOSPHAT / ml ANTIGEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH-WERT.

C) FÄLLUNG MIT NUKLEINSÄURE

I. Coxsackievirus B 4

Präzipitationsversuche mit Coxsackie-B4-Virus konnten mangels ausreichender Antigenmengen nicht durchgeführt werden.

II. Coxsackievirus B 5

1. Virusantigen und MS-Zellantigen: Die Konzentration der verwendeten Ribonukleinsäure lag bei 2.0 mg/ml Antigen. Wegen der besseren Löslichkeit wurde die RNS in n/10 NaOH aufgelöst. Wie aus Abb. 11 hervorgeht, wurden die Virusantigenkomponenten und das MS-Zellantiger unterhalb pH 4.4 vollständig ausgefällt. Zuerst erschien die N-Antigenkomponente bei pH 4.4 im Überstand. Es folgte die H-Komponente bei pH 4.6 und das MS-Zellantigen bei pH 5.0. Danach

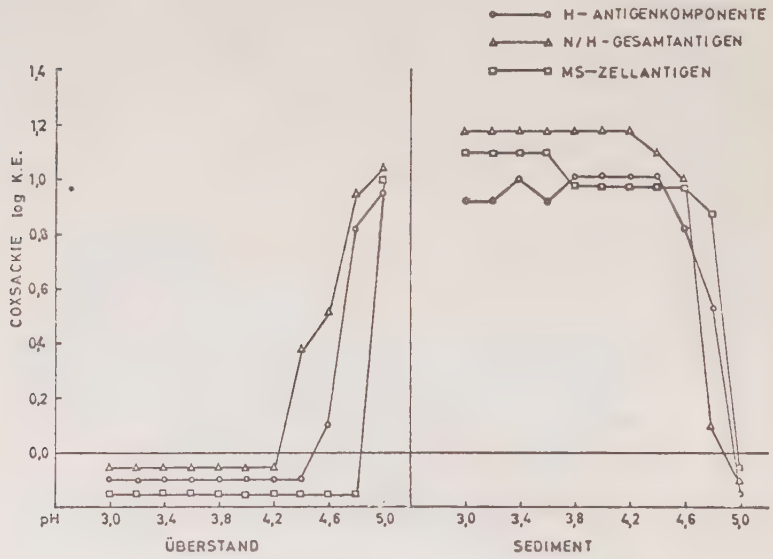

ABB.11: PRÄZIPITATION DER COXSACKIE-B5- ANTIGENKOMPONENTEN UND DES MS-ZELLANTIGENS MIT 2,0 mg NUCLEINSÄURE/ml ANTIGEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH-WERT.

zeigte die H-Komponente hier den breitesten Fällungsbereich, gefolgt von der N-Komponente und dem MS-Zellantigen. Die H-Komponente war bis pH 2.6 ebenso wie die N-Komponente praktisch in voller Höhe im Sediment nachweisbar.

2. Gesamtprotein: Nach Zugabe von 2.0 bzw. 0.5 mg Nukleinsäure/ml Antigen wurde nach der Methode von LOWRY et al. in Überstand und Sediment jeder Fällungsfraktion das Gesamtprotein bestimmt. Unterhalb von pH 4.4 war das Protein vollständig ausgefällt. Das Fällungsmaximum lag bei einem pH-Wert von 3.2 bis 3.4 (Abb. 12).

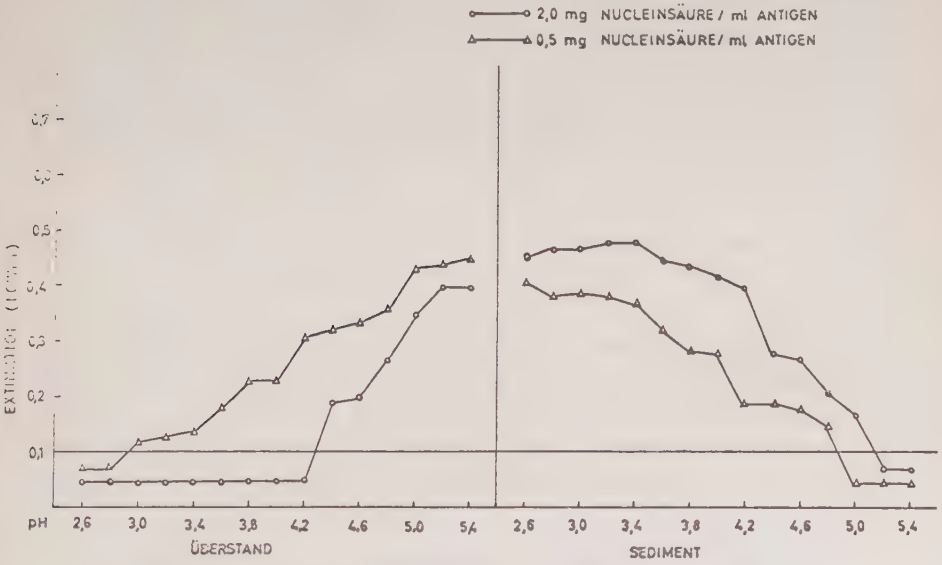

ABB. 12: PRÄZIPITATION DES GESAMTPROTEINS MIT HILFE UNTERSCHIEDLICHER NUCLEINSÄURE IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH-WERT.

Mit zunehmender Nukleinsäurekonzentration erfolgte eine Verschiebung der Fällung in den sauren Bereich.

D) FÄLLUNGSVERSUCHE MIT NATRIUMHEPTAPHOSPHAT UND PENTANATRIUMPHOSPHAT

I. Coxsackievirus B 4

Natriumheptaphosphat wurde in einer Konzentration von 2.0 und 10.0 mg/ml Antigen auf seine fällbaren Eigenschaften unter-

sucht. Der untersuchte pH-Bereich lag zwischen pH 2.6 und 5.0 mit Fällungsintervallen von 0.2 pH. Nach Zusatz des Polyphosphatsalzes und Einstellung der verschiedenen pH-Werte bildete sich nach einer Stunde Aufenthalt der Fraktionen im Kühlschrank kein Sediment. Die entsprechenden Versuche mit Pentanatriumtriphosphat verliefen ebenfalls negativ.

II. Coxsackievirus B 5

Auch mit Coxsackie-B5-Virussuspensionen zeigten die Fällungsversuche mit Natriumheptaphosphat und Pentanatriumtriphosphat nur negative Ergebnisse.

E) PH-EMPFINDLICHKEIT DER COXSACKIE-B4-ANTIGENKOMPONENTEN NACH ZUGABE DER VERWENDETEN FÄLLUNGSMITTEL

1. Polyphosphorsäure: Nach Zugabe von 2.0 mg Polyphosphorsäure/ml Antigen blieb der Gehalt der Virussuspension an H-Antigenkomponenten von pH 4.0 bis 3.6 konstant. Unterhalb des letzteren Wertes sank der KBR-Titer der H-Komponente zunehmend ab, bis zu einem Minimum bei pH 2.8 (Abb. 13). Der Gehalt an Gesamtantigen nahm hingegen erst ab pH 3.0 geringfügig ab. Nach Abzug der H-Komponente vom Gesamtantigengehalt der untersuchten Virussuspension ergab sich damit eine Zunahme des relativen Anteils der N-Komponente unterhalb von pH 3.4.

2. Nona-Natriumheptaphosphat: Nach Zugabe von 2.0 mg Nona-Natriumheptaphosphat ergab sich ein sehr ähnliches Bild bezüglich der Empfindlichkeit der Antigenkomponenten. Nur der Abfall des H-Antigengehaltes unterhalb pH 3.2 war etwas weniger steil.

3. Nukleinsäure: Nach Zugabe von 2.0 mg Nukleinsäure/ml Antigen konnte erst ab pH 3.0 ein Abfall des H-Antigen-Titers verzeichnet werden. Das Gesamtantigen nahm hingegen schon ab pH 3.2 allmählich ab (Abb. 13).

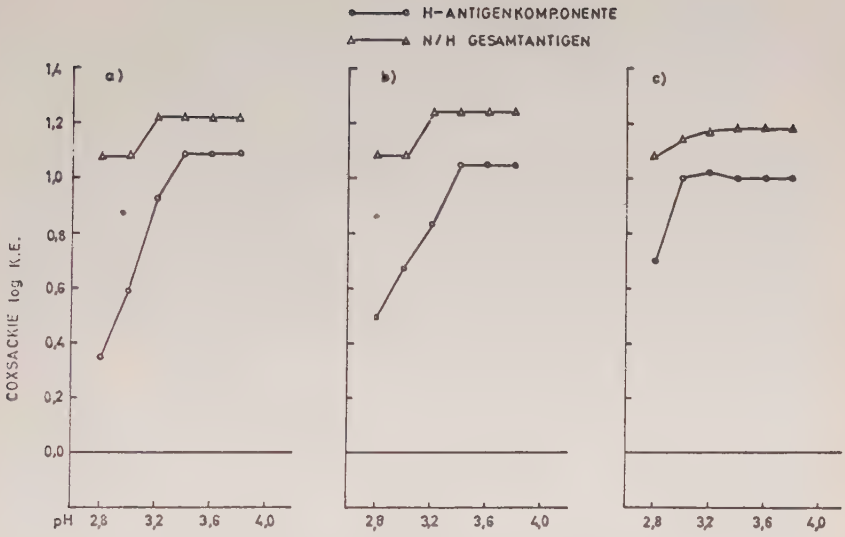

ABB. 13 : pH-EMPFINDLICHKEIT DER COXSACKIE-B4-ANTIGENKOMPONENTEN NACH HINZUFÜGEN VERSCHIEDENER FÄLLUNGSMITTEL :
a) ZUGABE VON 2,0 mg POLYPHOSPHORSÄURE/ ml ANTIGEN
b) ZUGABE VON 2,0 mg NONANATRIUMHEPTAPHOSPHAT/ ml ANTIGEN
c) ZUGABE VON 2,0 mg NUCLEINSÄURE / ml ANTIGEN

F) PH-EMPFINDLICHKEIT DER COXSACKIE-B5-ANTIGENKOMPONENTEN NACH ZUGABE DER BRAUCHBAREN FÄLLUNGSMITTEL (ABB. 14)

1. Polyphosphorsäure: Die Polyphosphorsäure wurde in einer Konzentration von 2.0 und 0.5 mg/ml Antigen zugegeben. Bei der höheren Konzentration kam es etwas früher zur Abnahme der H-Komponente und ebenso des Gesamtantigens. Die pH-Empfindlichkeit der Coxsackie-B5-Antigenkomponenten nahm also mit steigender Polyphosphatkonzentration zu.

2. Nona-Natriumheptaphosphat: Bei den pH-Empfindlichkeitsuntersuchungen mit Nona-Natriumheptaphosphat verhielten sich die Antigen-Komponenten ähnlich wie oben bei gleichen Konzentrationen des Fällungsmittels. Es kam nämlich zu einer Zunahme der pH-Empfindlichkeit mit steigender Konzentration des Polyphosphates.

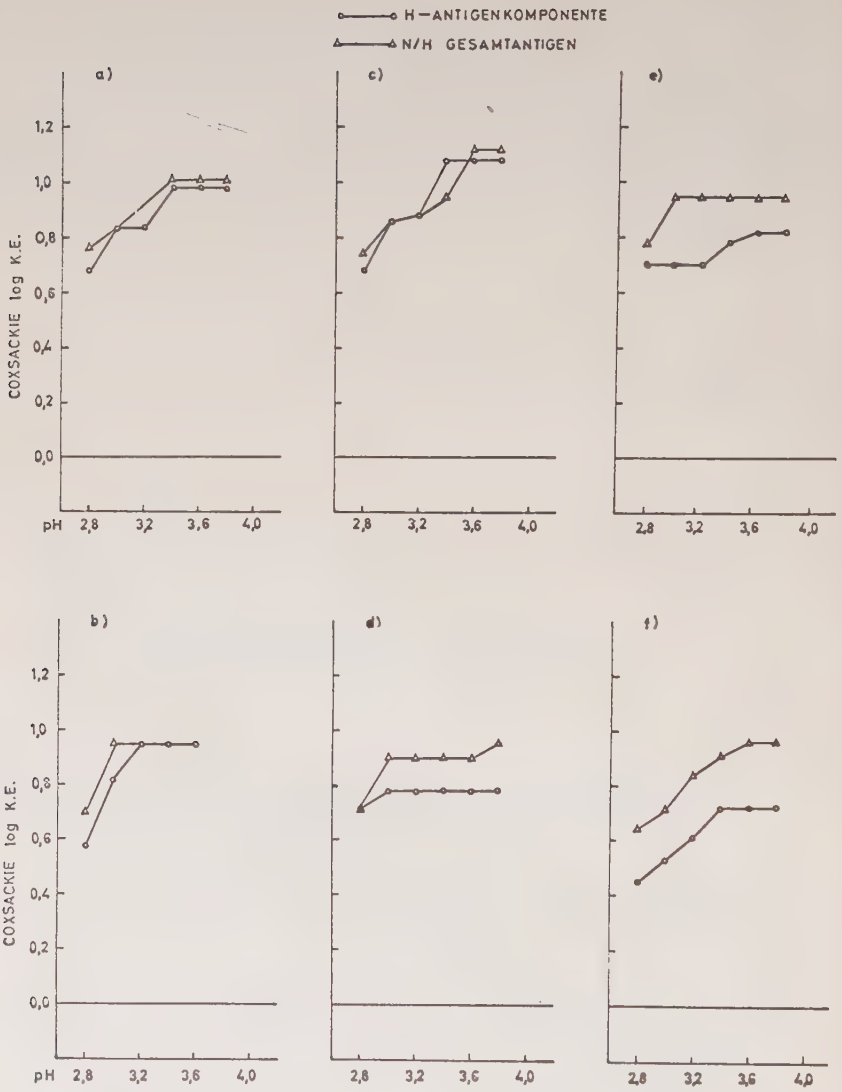

*ABB. 14 : pH- EMPFINDLICHKEIT DER COXSACKIE -B5-ANTIGENKOMPONENTEN NACH HINZUFÜGEN VERSCHIEDENER FÄLLUNGSMITTEL :

a) 2,0 mg POLYPHOSPHORSÄURE / ml ANTIGEN
b) 0,5 mg POLYPHOSPHORSÄURE/ ml ANTIGEN
c) 2,0 mg NONANATRIUMHEPTAPHOSPHAT / ml ANTIGEN
d) 0,5 mg NONANATRIUMHEPTAPHOSPHAT/ ml ANTIGEN
e) 2,0 mg NUCLEINSÄURE / ml ANTIGEN
f) 0,5 mg NUCLEINSÄURE/ ml ANTIGEN

Bei der niedrigeren Konzentration des Fällungsmittels nahm die N-Komponente sowie das Gesamtantigen sogar erst ab pH 2.8 ab.

3. Nukleinsäure: Nukleinsäurezugabe verringerte bei höherer Konzentration die pH-Empfindlichkeit besonders der N-Komponente, weniger stark die der H-Komponente. Bei einer niedrigeren Konzentration des Fällungsmittels fiel der Titer der N-Komponente bereits unterhalb pH 3.4 deutlich ab.

DISKUSSION

Unter der Vielzahl von Konzentrations- und Reinigungsverfahren für Enteroviren, die seit Entdeckung der ersten Virusstämme (17) angewendet werden, waren nur wenige, die eine Trennung der Viruskomponenten ermöglichten.

Die Mehrschrittmethode von SCHWERDT und SCHAFFER (107) brachte zwar einige Aufschlüsse über die Eigenschaften der Polioantigene, war jedoch für die Konzentration der aus Hela-Zellen gewonnenen Polioantigene nicht sehr geeignet. Es fand sich nämlich nur ein Teil der Infektiosität, die im Ausgangsmaterial nachgewiesen wurde, nach der Präzipitation im Sediment wieder. Entsprechend lag der KB-Titer für die N-Komponente niedriger, hingegen hatte der Titer für die H-Komponente den zwei- bis dreifachen Wert. Dass Zellprotein aus der Gewebekultur (Hela-Zellen) war gleichfalls kaum vermindert, so daß von einem Reinigungseffekt durch die Methanol-Fällung kaum gesprochen werden konnte. Erst durch die weitere Behandlung des Sedimentes, die mit der Fraktionierung im Dichtegradienten beendet wurde, ließen sich ausreichend gereinigte, antigene Viruskomponenten, wenn auch nur in geringer Menge, herstellen.

Die Arbeitsgruppe um MAYER (62), die u.a. auch das Verfahren von SCHWERDT und SCHAFFER (107) zur Gewinnung von Polioantigenen anwendete, wies anhand der Infektiositätsbestimmung nach, daß von den in der KBR wirksamen Endprodukten nur die D-Fraktion infektiös war. Zum gleichen Ergebnis gelangten MAYER et al. (62) bei der immunologischen Charakterisierung der Endprodukte einer nach CHARNEY (12) modifizierten Methode von SCHWERDT und SCHAFFER. CHARNEY (12) ersetzte als zweiten Verfahrensschritt die Butanolbehandlung des Präparates durch eine Fermentierung. Die erneute Präzipitation führe er bei einem pH-Wert von 2.5 statt 4.5 durch. Es folgte die Ultrazentrifugation des resuspendierten Sedimentes und schließlich, in Übereinstimmung mit SCHWERDT und SCHAFFER

(167) als letzter Schritt die endgültige Trennung der Komponenten durch Ultrazentrifugation im Zuckerdichtegradienten. Als Methode der Wahl sahen MAYER et al. (62) das "John-Hopkins"-Verfahren an, das ebenfalls eine Modifikation der Prozedur von SCHWERDT und SCHAFFER (107) darstellte. Durch Weglassen der zweiten Virusfällung, der Enzymbehandlung und auch der Methanolextraktion bot es zwar den Vorteil der einfacheren Durchführung und schonenderen Behandlung des Virusmaterials, war jedoch insgesamt gesehen noch ziemlich umständlich. Mit allen drei Varianten der SCHWERDT und SCHAFFER Methode konnte eine Ausbeute von etwa 50 % gereinigtem Virus bezogen auf das Ausgangsmaterial, erzielt werden. Jedoch lag der Anteil der infektiösen Viruspartikel an der Gesamtmasse der Virusantigene unter 11 % (62).

Bei dem Versuch, Coxsackieviren in kristalliner Form darzustellen wandten MATTERN und duBUY (59) ein kombiniertes Reinigungs- und Konzentrationsverfahren an, das unter anderem zwei Fällungen mit ansteigender Ammoniumsulfatkonzentration umfaßte. Daran schloß sich Dialyse, Behandlung mit Äthanol und Ultrazentrifugation an. Das Endprodukt wurde weder serologisch untersucht noch differenzierte man mehrere antigene Viruskomponenten.

Mit Verfahren, bei denen durch Evaporation zunächst eine Volumeneinengung des Ausgangsmaterials und durch nachfolgende Ultrazentrifugation allein oder in Kombination mit Chromatographie eine Reinigung erzielt werden konnte, war es ebensowenig möglich, Einkomponentenantigene herzustellen (2, 56, 75).

SMOLENS et al. (109), die durch Fällung von Poliovirusrohantigen mit Zinklaktat bei pH 7.5, Entfernung des Fällungsmittels durch Natriumzitrat und anschließender Dialyse weitgehend gereinigtes Poliovirus bei minimalem Infektiositätsverlust herstellen konnten, untersuchten das Endprodukt gleichfalls nicht auf seinen Gehalt an verschiedenen Komponenten.

CHARNEY et al. (13) verwendeten Nukleinsäure in einer Konzentration von 0.2 mg/ml Antigen bei einem pH-Wert von 3.5 zur Gewinnung eines konzentrierten und gereinigten Polio-Viruspräparates. Mit dem durch Formaldehyd inaktivierten Polioantigen vermochten sie bei Menschen und Versuchstieren die Bildung neutralisierender Antikörper hervorzurufen. Allerdings betrachteten die Autoren ihr Verfahren nur als ersten Schritt eines weitergehenden Reinigungsprozesses, da das Viruspräparat noch aus verschiedenen antigenen Komponenten bestand.

In einem Einschrittfällungsverfahren benutzten GROSSOWICZ et al. (26) verschiedene zweiwertige Schwermetallionen (Ca^{++}, Ba^{++}, Co^{++}) in einer Konzentration von 1 mg/ml Antigen bei einem optimalen pH-Wert von 9.0 zur Gewinnung von inaktiviertem und infektiösem Polioantigen. Die Konzentration des Endproduktes an Virusantigen war zwar 100- bis 1000-fach höher als im Ausgangsmaterial bei unbedeutendem Verlust bezüglich Gesamtantigengehalt, doch wurde keine zusätzliche Reinigung erzielt.

Bessere Ergebnisse erreichte SCHMIDT in den folgenden Jahren (97, 99, 101, 102, 105), der nach verschiedenen Methoden Enteroviren teilweise bis zur Gewinnung eines Einkomponentenantigens konzentrierte und reinigte.

Mit dem zunächst angewandten Verfahren der Virusfällung nach Entsalzung durch Schlauchdialyse (97) erreichte er zwar eine ausgezeichnete Infektiositätsausbeute im Sediment, wobei die N- und H-Komponenten des Ausgangsmaterials vollständig wiedergefunden werden konnten, doch war eine Trennung der Komponenten damit nicht möglich. Hingegen konnte er durch Vollentsalzung von Poliovirusssuspensionen mit dem Mischbett-Ionenaustauscher nicht nur beliebig große Volumina gut konzentrieren, sondern im gleichen Arbeitsgang auch reinigen. Bei einem pH-Wert von 5.0 und anschließender Zentrifugation wurde ein Sediment gewonnen, das nur die N-Komponente enthielt. Der Infektiositätsverlust gegenüber dem Ausgangsmaterial war

nur gering. Gleich gute Ergebnisse erzielte SCHMIDT (99) mit der vereinfachten Methode der "Simultanentsalzung" von Poliovirussuspensionen. Aus dem nach Ansäuern auf pH 5.5 und Zentrifugation erhaltenen Präzipitat war die H-Komponente vollständig und das Hela-Zellantigen weitgehend beseitigt worden.

Mit Hilfe von Polyphosphorsäure gelang es SCHMIDT (102), eine fraktionierte Fällung der serologisch bestimmbaren Polio-Antigenkomponenten durchzuführen. Durch Zusatz von Phosphorsäure in der niedrigen Konzentration von 0.1 mg/ml Antigen konnte die N-Komponente in einem bestimmten pH-Bereich von der H-Komponente und dem Hela-Zellantigen abgetrennt werden. Beim Poliovirus Typ I lag der für einen Trenneffekt optimale pH-Wert bei 3.5, d.h. bei dieser Wasserstoffionenkonzentration präzipitierten die H-Komponente und das Hela-Zellantigen vollständig, während das intakte Virus im Überstand verblieb. Die serologische Untersuchung ließ außer bei Fällungen im stark sauren Bereich keine Denaturierung der Antigenkomponenten erkennen.

WITT und BRUNOTTE (123) benutzten Zinklaktat und Kobaltchlorid als Fällungsmittel zur Reinigung und Konzentration von Poliovirussuspensionen. Durch Verwendung einer Zinklaktatkonzentration von maximal 0.05 M bei pH 7.5 erhielten sie zwar ein um den Faktor 32 an Viruspartikeln angereichertes, jedoch ungereinigtes Sediment. Fällungen mit Kobaltchlorid in einer Konzentration von 1 mg Co^{++}/ml Antigen brachten noch schlechtere Ergebnisse, da es gleichzeitig mit der Anreicherung an Poliovirusantigen zu einem Anstieg der Fremdantigene kam.

Zur Gewinnung eines geeigneten KBR-Antigens aus Polio- und Coxsackievirussuspensionen verwendeten VINCENT und BETAIL (114) 0.1 molare Natriumphytat-Lösung bei einem pH-Wert von 2.5 als Fällungs-Absorptionsmittel in einem Mehrschrittverfahren. Die weitere Behandlung bestand in Dialyse, Sephadexchromatographie und nochmaliger Dialyse. Die Endfraktionen mit dem höchsten Virusgehalt, gemessen an Infektiosität und

KBR-Titer, enthielten jedoch relativ kaum weniger Fremdeiweiß als das Ausgangsmaterial, so daß der Reinigungseffekt dieser Methode sehr gering war. Eine Untersuchung der konzentrierten Fraktionen auf den Gehalt an verschiedenen, antigenen Viruskomponenten wurde nicht durchgeführt.

Unsere Fällungsversuche mit den Coxsackieviren B4 und B5 verliefen nur beim Typ B4 erfolgreich im Sinne einer Fraktionierung der Antigene. Bei Verwendung der niedrigeren Polyphosphorsäurekonzentration (0.5 mg/ml Antigen) verblieb etwa 55 - 60 % der N-Komponente um pH 3.6 im Überstand, während die H-Komponente und das MS-Zellantigen vollständig ausgefällt wurden. Der überwiegende Teil des intakten Virus (N-Komponente) konnte also von den beiden übrigen Komponenten isoliert werden. Andererseits enthielt das Sediment unterhalb pH 3.2 kein H-Antigen des Coxsackie-B4-Virus, das dieses vollständig eliminiert wurde. Gleichzeitig mit der Konzentration wurde also eine wenn auch nur partielle Reinigung erzielt. Mit höherer Polyphosphorsäurekonzentration (2.0 mg/ml Antigen) verschob sich der Fällungsbereich der Coxsackie-B4-Antigene etwas ins Alkalische. Eine Abtrennung der N-Komponente war nicht möglich, hingegen war das Sediment unterhalb pH 3.2 frei von H-Antigenen.

Unabhängig von der verwendeten Polyphosphorsäurekonzentration ließ sich das MS-Zellantigen auch in dem Bereich stärkerer Azidität, wo die H-Komponente völlig zerstört wurde, nur gemeinsam mit der N-Komponente ausfällen. Die Ursache dafür liegt wohl in der komplexen Zusammenstellung der MS-Zellproteine. Das Fällungsmuster war bei beiden Polyphosphorsäurekonzentrationen mit der Reihenfolge MS-Zellantigen ⟶ H-Antigen ⟶ N-Antigen gleich.

Auch mit dem Fällungsmittel Nonanatriumheptaphosphat ließ sich in niedriger Konzentration (0.5 mg/ml Antigen) eine Fraktionierung der Coxsackie-B4-Antigene erzielen. Das intakte Virus blieb zwar um pH 3.6 ebenfalls größtenteils (55 %) im Überstand, jedoch enthielt dieser noch einen geringen An-

teil (30 %) des MS-Zellantigens. Bei Verwendung einer höheren Konzentration des Fällungsmittels (2.0 mg/ml Antigen) ging dieser Trennungseffekt wie bei der Polyphosphorsäure völlig verloren. Ebenso kam es zu einer leichten Verschiebung des Fällungsbereiches der Coxsackie-B4-Antigene ins Alkalische und zur Zerstörung der H-Komponente im Bereich stärkerer Azidität. Das Fällungsmuster änderte sich durch Verwendung von Nonanatriumheptaphosphat nicht wesentlich.

Die Ergebnisse der Eiweißfällungen zeigen die gute Eignung beider Fällungsmittel zur Proteinpräzipitation. Bemerkenswert ist, daß sowohl mit Polyphosphorsäure als auch mit Nonanatriumheptaphosphat in niedriger Konzentration der Überstand unterhalb pH 3.6 frei von Protein ist. Es bedeutet, daß zumindest mit Polyphosphorsäure eine alleinige Abtrennung der N-Komponente von den übrigen antigen wirksamen Substanzen möglich ist.

Die Präzipitationsversuche zur Fraktionierung der Antigenkomponenten des Coxsackievirus B5, bei denen zunächst noch Nukleinsäure zur Anwendung kam, verliefen weniger erfolgreich. Mit Polyphosphorsäure als Fällungsmittel ließ sich weder in niedriger noch höherer Konzentration ein eindeutiger, außerhalb der Fehlerbreite der verwendeten Methode liegender Trenneffekt erzielen.

Hingegen war es bei Verwendung von Nonanatriumheptaphosphat möglich, unterhalb von pH 3.0 ein Sediment zu gewinnen, das kein H-Antigen mehr enthielt. Eine Abtrennung der H-Komponente im Überstand war auch hier nicht möglich.

Mit Nukleinsäure als Fällungsmittel war ebenfalls keine Fraktionierung der Antigenkomponenten des Coxsackie-B5-Virus zu erzielen.

Die Herstellung eines gereinigten und konzentrierten N-Antigens des Coxsackie-B4-Virus zur Anwendung in der diagnosti-

schen KBR ist nach unserer Methode somit auf zwei Wegen möglich. Einmal läßt sich die N-Komponente zunächst durch Ausfällung der übrigen Antigene bei etwa pH 3.5 mit dem Überstand abtrennen, womit zunächst ein Reinigungseffekt erzielt wird. Zur Konzentration des kompletten Virus könnte man eine erneute Fällung bei einem pH-Wert von etwa 3.0 anschließen, da hierbei die N-Komponente vollständig ausgefüllt werden kann, ohne daß eine nennenswerte Schädigung auftritt.

Der zweite Weg erlaubt die Verwendung höherer Polyphosphatkonzentrationen. Nach Eliminierung der H-Komponente durch Präzipitation bei einem pH-Wert von etwa 2.6 - 3.0 ist zur Entfernung des Fällungsmittels nach Aufnahme der Polyphosphat-Proteinkomplexe in schwach alkalischem Gebiet Ultrazentrifugation, Ionenaustausch oder Dialyse angezeigt.

Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit den von SCHMIDT (102) an Poliovirus-Antigenen durchgeführten Fällungen läßt einige bemerkenswerte Übereinstimmungen erkennen. Das pH-Optimum für eine Abtrennung der N-Komponente des Poliovirus Typ I und Coxsackievirus Typ 4 liegt bei annähernd dem gleichen Wert. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die verwendete Polyphosphatkonzentration bei SCHMIDT (102) deutlich niedriger liegt (0.1 mg/ml Antigen). Bei höherer Konzentration des Fällungsmittels (0.5 mg/ml Antigen) läßt sich das komplette Poliovirus Typ I erst nach Verdoppelung der Ionenstärke gegenüber dem Ausgangswert bei einem pH-Wert zwischen 3.2 und 3.4 fraktioniert ausfällen. Demnach müßte das von uns verwendete Rohantigen entweder von vornherein eine höhere Ionenstärke besitzen oder das unterschiedliche Fällungsmuster beruht auf differenten physikochemischen Eigenschaften von Polio- und Coxsackieantigen-Komponenten. Wir ließen die Ionenstärke unserer Rohantigenchargen bewußt unverändert, um die Methode nicht zu kompliziert zu gestalten. Aus dem gleichen Grunde variierten wir auch den Proteingehalt oder die Dielektrizitätskonstante der Chargen nicht.

In Übereinstimmung mit SCHMIDT (102) ist bei Verwendung noch höherer Polyphosphatkonzentrationen eine allgemeine Verschiebung der Fällungsbereiche zum Alkalischen hin festzustellen, jedoch keine fraktionierte Fällung mehr möglich.

Im Gegensatz zum Coxsackievirus B4 verlaufen die Versuche, Antigenkomponenten des Typs B5 fraktioniert zu präzipitieren, durchweg negativ. Erstaunlich ist die weitgehende Übereinstimmung der Fällungsbereiche der N- und H-Komponente. Analoge Resultate verzeichnet SCHMIDT (102) beim Poliovirus Typ II.

Hinsichtlich der pH-Resistenz zeigen die Antigenkomponenten des Typs B5 bemerkenswerte Unterschiede zum Typ B4. Während beide Komponenten des Typs B4 bei Verwendung von Nukleinsäure unterhalb pH 3.4 völlig zerstört werden, bleiben infektiöses Virus und Virushülle des Typs B5 bis pH 3.0 völlig intakt. Mit Polyphosphorsäure wird bei höherer Konzentration im niedrigen pH-Bereich nur "H" zerstört, während bei niedriger Konzentration größtenteils auch "N" mit zerstört wird. Unabhängig von der verwendeten Konzentration wird mit Nonanatriumheptaphosphat nur die H-Komponente im stärker sauren Bereich zerstört, was für beide Virustypen gilt. In diesem Zusammenhang ist die Arbeitvon VINCENT und BETAIL (114) erwähnenswert, die mit Natriumphytat als Fällungsmittel einige Enteroviren, darunter auch Coxsackievirus B5 bei einem pH-Wert von 2.5 gut konzentrieren konnten, ohne daß ein nennenswerter Infektionsitätsverlust auftrat. In Übereinstimmung damit fand SCHMIDT (102), daß die N-Komponente sämtlicher Poliovirustypen in polyphosphorsäurehaltigem Milieu bei einem pH-Wert von 2.0 sogar nach zwei Stunden Aufenthalt kaum einen Verlust ihrer serologischen Aktivität erlitt, während die H-Komponente schon unterhalb pH 4.0 völlig zerstört wurde.

Die bisherigen Untersuchungen über die fraktionierte Fällbarkeit von Enteroviren zeigen also, daß innerhalb der Untergruppen Virustypen, die in ihrem serologischen Verhalten sehr ähnlich sind, unterschiedlich reagieren können. Dieses

Ergebnis macht es notwendig, vor Anwendung der Methode auf weitere Enteroviren, von Fall zu Fall eine Fraktionierung durch Präzipitation zu prüfen. Das Verfahren ist jedoch im Vergleich mit den bisherigen Methoden recht brauchbar, um Virusantigene, die z.B. in der diagnostischen KBR benötigt werden, schnell und schonend in ausreichender Konzentration zu gewinnen.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Polyphosphorsäure und drei weiteren Polyphosphaten (Natriumtrimetaphosphat, Pentanatriumtriphosphat, Nonanatriumheptaphosphat) wird die fraktionierte Fällbarkeit von Antigenkomponenten der Coxsackieviren B4 und B5 geprüft. Außerdem werden Versuche zur Fällung der Coxsackie-B5-Antigene mit Nukleinsäure durchgeführt. Der Antigengehalt der Fällungsfraktionen wird serologisch, der Proteingehalt photometrisch bestimmt.

1. Die Coxsackie-B4-Antigenbestandteile (N-Antigen, H-Antigen) lassen sich mit Polyphosphorsäure und Nonanatriumheptaphosphat durch Variation des pH-Wertes fraktioniert fällen. Da das Gesamtprotein und das MS-Zellantigen im gleichen pH-Bereich wie die Viruskomponenten größtenteils ausgefällt werden, kann eine zusätzliche Reinigung nicht erzielt werden.

2. Die Coxsackie-B5-Antigenkomponenten lassen sich hingegen weder mit Polyphosphorsäure, Nonanatriumheptaphosphat, noch mit Nukleinsäure fraktioniert fällen.

3. Die Fällungsversuche mit Natriumtrimetaphosphat und Pentanatriumtriphosphat verlaufen bei beiden Coxsackieviren negativ.

Die Ergebnisse werden diskutiert und mit dem Schrifttum verglichen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALBANO, A. — Methodologischer Beitrag zur Konzentration und Reinigung von Poliomyelitisviren. Arch.ges.Virusforsch. 7, 494 (1957)

2. ALBANO, A. — Über einige einfache Methoden zur Konzentration von Viren. Zbl.f.Bakt. I Orig. 181, 451 (1961)

3. BARSKI, G. — The significance of in vitro cellular lesions for classification of enteroviruses. Virology 18, 152 (1962)

4. BAUMEISTER, J. and MILLER, C.A. — The preparation of Poiomyelitis complement-fixing antigens from infected tissue culture fluids. J.Inf.Dis. 98, 27 (1956)

5. BERGER, E. und VEST, M. — Diagnostische Anwendbarkeit und Grenzen der Komplementbindungsreaktion bei Poliomyelitis. Med.Wochenschr. 86, 776 (1956)

6. BERGLUND, A., BÖTTIGER, M., JOHNSSON, T., and WESTERMARKS, S.E. — An outbreak of aseptic meningitis with a Rubella-like rash probably caused by Echovirus Typ 9. Arch.ges.Virusforsch. 8, 294 (1958)

7. BLACK, F.L. — Poliomyelitis complement fixing antibodies and their demonstration. N.Y.Acad.Sci. 61, 781 (1955)

8. BLACK, F.L. and MELNICK, J.L. — The specifity of the complement fixation test in Poliomyelitis. Yale, J.Biol.Med. 26, 385 (1954)

9. BLACK, F.L. and MELNICK, J.L. — Appearance of soluble and cross-reactive complement fixing antigens on treatment of poliovirus with formalin. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 89, 353 (1955)

10. BUCKLAND, F.E., BYNOE, M.L., ROSEN, L., and TYRELL, J. — Inoculation of human volunteers with Echo virus type 20. Brit.Med.J. 1, 397 (1961)

11. BUSSELL, R.H., BARRON, A.L., KARZON, D.T., and HALL, F.T. — Hemagglutination-inhibiting, complement fixing and neutralizing antibody responses in Echo-6 infection, including studies on heterotypic responses. J.Immun. 88, 47 (1962)

12. CHARNEY, J., FISHER, W.P., and MACHLOWITZ, R.A.
Preparation and inactivation of purified polioviruses: Comparison of vaccines derived from Mahoney and Parker enteroviruses
Proc.Soc.Exp.Biol., 96, 601 (1957)

13. CHARNEY, J., MACHLOWITZ, R., TYBELL, A.A., SAGIN, J.F., and SPICER, D.S.
The concentration and purification of poliomyelitis virus by the use of nucleic acid precipitation
Virology 15, 269 (1961)

14. COMMITTEE ON THE ECHO VIRUSES
National foundation for infantile paralysis. Enteric cytopathogenic human orphan (Echo) viruses
Science 122, 1187 (1955)

15. COMMITTEE ON THE ENTEROVIRUSES NFJP
The enteroviruses
Amer.J.publ.Heth. 47, 1556 (1957)

16. COMMITTEE ON ENTEROVIRUSES
Classification of human enteroviruses
Virology 16, 501 (1962)

17. DALLDORF, G., STICKLES, G.M., PLAGER, H., and GIFFORD, R.
A virus recovered from the feces of 'poliomyelitis' patients pathogenic for suckling mice
J.Exp.Med. 89, 567 (1949)

18. DEIBEL, R., und VIVELL, O.
Erfahrungen mit der Komplementbindungsreaktion auf Poliomyelitis bei Verwendung inaktivierter Antigene
Z.Kinderheilkde. 80, 607 (1958)

19. EICHENWALD, H.F., ABABIO, A., ARKY, A., and HARTMANN, A.P.
Epidemic diarrhoe in premature and older infants caused by Echo virus type 18
J.Am.Med.Ass. 166, 1563 (1958)

20. ENDERS, J.F., WELLER, T.H., and ROBBINS, F.C.
Cultivation of the lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues
Science 109, 85 (1949)

21. FANTES, K.H.
Concentration and partial purification of poliomyelitis viruses
J.Hyg. 60, 123 (1962)

22. FROMMHAGEN, L.H.
The separation and physicochemical properties of the C and D antigens of coxsackievirus
J.Immun. 95, 818 (1965)

23. FULTON, F. and
The serological comparison of strains of influenza virus
J.Gen.Microbiol. 3, 97 (1949)

24. GODENNE, M.O. and RIORDAN, J.T.
Tissue culture diagnosis of poliomyelitis and aseptic meningitis
J.Am.Med.Ass. 158, 707 (1955)

25. GRIST, N.R. — An outbreak of 'paralytic poliomyelitis' due to Coxsackie A 7 virus
Europ.Ass.Poliom., 7.Symp.,Oxford (1961)

26. GROSSOWICZ, N., MERCADO, A., and GOLDBLUM, N. — A simple method for concentration of live and formaldehyd inactivated poliovirus
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 103, 872 (1960)

27. HAAS, R. und VIVELL, O. — Virus- und Rickettsieninfektionen des Menschen
Lehmanns Verl. München (1965)

28. HALONEN, P., HUEBNER, R.J., and TURNER, H.C. — Preparation of Echo complement fixing antigens in monkey kidney tissue cultures and their purification by fluorocarbon
Proc.Soc.Exp.Biol. 97, 530 (1958)

29. HALONEN, P., ROSEN, L., and HUEBNER, R.J. — Homologous and heterologous complement fixing antibody in persons infected with Echo, Coxsackie, and poliomyelitis viruses
Proc.Soc.Exp.Biol. 101, 236 (1959)

30. HAMMON, W.Mc., YOHN, D.S., LUDWIG, E.H., PAVIA, R.A., SATHER, G.E., and McCLOSKEY,L.W. — A study of certain nonpoliomyelitis and poliomyelitis enterovirus infections
J.Am.Med.Ass. 167, 727 (1958)

31. HAMPARIAN, U.U., MÜLLER, F., and HUMMELER, K. — Elimination of non-specific components from viral antigens by fluorocarbon
J.Immun. 80, 468 (1958)

32. HENNESSEN, W. — Die serologische Diagnose der Poliomyelitis
Dt.Med.Wochenschr. 80, 1044 (1955)

33. HERTENSTEIN, C. — Herstellung eines komplementbindenden Antigens für die Poliomyelitisdiagnose
Zbl.Bakt., 1.Orig. 178, 413 (1960)

34. HINUMA, Y., KATAGIRI, S., FUKUDA, M., FUKUSHI, K., and WATANABE, Y. — Kinetic studies on the thermal degredation of purified poliovirus
Biken J. 8, 143 (1965)

35. HSIUNG, G.D., and MELNICK, J.L. — Morphologic characteristics of plaques produced on monkey kidney monolayer cultures by enteric viruses (poliomyelitis, coxsackie and Echo groups)
J.Immunol. 78, 128 (1957)

36. HUMMELER, K., and HAMPARIAN, V. — Removal of anticomplementary activity and host antigens from viral preparation by fluorocarbon. Science 125, 547 (1957)

37. HUMMELER, K., and HAMPARIAN, V. — Studies on the complement fixing antigens of poliomyelitis, I. Demonstration of type- and group-specific antigens in native and heated viral preparations. J.Immunol. 81, 499 (1958)

38. HUMMELER, K., and TUMILOWICZ, J. — Studies on the complement fixing antigens of poliomyelitis, II. Preparation of type-specific anti-N and anti-H indicator sera. J. Immunol. 84, 630 (1960)

39. INTERNATIONAL ENTEROVIRUS STUDY GROUP — Picornaviruses. Virology 19, 114 (1963)

40. ITOH, H., and MELNICK, J.L. — The infection of chimpanzees with Echo viruses. J.exp.Med. 106, 677 (1967)

41. JOHNSSON, K.M., BLOOM, H.H., MUFSON, M.A., and CHANOCK, R.M. — Acute respiratory diseases associated with coxsackie A 21 virus infection, I. Incidence in military personnel: Observations in a recruit population. J.Am.Med.Ass. 179, 112 (1962)

42. JOHNSSON, T., BÖTTIGER, M., and LÖFDAHL, A. — An outbreak of aseptic meningitis with a rubella like rash probably caused by Echo virus, type 4. Arch.ges.Virusforsch. 8, 306 (1958)

43. JOHNSSON, T., LYCKE, E., WICTORIN, B., and JÖNSSON, B. — Studies of an epidemic of aseptic meningitis in association with coxsackie and Echo viruses. Arch.ges.Virusforsch. 8, 285 (1958)

44. KÄCKELL, M., LENNARTZ, H., und MAAS, G. — Zur serologischen Diagnostik der Poliomyelitis (Durchführung der Komplementbindungsreaktion mit verschiedenen Methoden). Klin.Wochenschr. 35, 126 (1957)

45. KAIGHN, M.E., MOSCARELLO, M.A., and FIERST, C.R. — Purification of murine Encephalovirus myelitis. Virology 23, 183 (1964)

46. KATAGIRI, S., HINUMA, Y., and ISHIDA, N. — Biophysical properties of poliovirus particles irradiated with ultraviolet light. Virology 32, 337 (1967)

47. KUWERT, E. und LENNARTZ, H. — Zur Serologie der Infektion mit Coxsackie B 5 Virus. Zbl.Bakt., Orig. 191, 127 (1963)

48. LeBOUVIER, G.L. — The modification of poliovirus antigens by heat and ultraviolet light. Lancet 2, 1013 (1955)

49. LeBOUVIER, G.L. — The D-C change in poliovirus particles. Brit.J.Exp.Path. 40, 605 (1959)

50. LeBOUVIER, G.L., SCHWERDT, C.E., and SCHAFFER, F.L. — Specific precipitates in agar with purified poliovirus. Virology 4, 590 (1957)

51. LENNARTZ, H., HERTENSTEIN, C. und GRUSEMANN-HAKE, R. — Die Antikörperbildung nach Schutzimpfungen mit inaktiviertem Poliomyelitisvirus. Dt.Med.Wochenschr. 83, 286 (1958)

52. LENNARTZ, H., HERTENSTEIN, C. und GRÜSEMANN-HAKE, R. — Komplementbindende Antikörper nach Impfung mit inaktiviertem Poliovirus. Klin.Wochenschr. 37, 1261 (1959)

53. LENNETTE, E.H. and SCHMIDT, N.J. — Studies on the development and persistence of complement fixing and neutralizing antibodies in human poliomyelitis. A.J.Hyg. 65, 210 (1957)

54. LENNETTE, E.H., SCHMIDT, N.J., and MAGOFFIN, R.L. — Observations on the complement fixing antibody response to poliovirus in patients with certain coxsackie and Echo virus infections. J.Immunol. 86, 552 (1961)

55. LERNER, A.M., LEVIN, H.S., and FINLAND, M. — Age and susceptibility of mice to Coxsackie A viruses. J.Exp.Med. 115, 745 (1962)

56. LEVINTOW, L., and DARNELL, J.E. jr. — A simplified procedure for purification of large amounts of poliovirus: Characterization and amino acid analysis of type I poliovirus. J.Biol.Chem. 235, 70 (1960)

57. LeMONACO, G.B. — Fissazione del complemento per la poliomielite con antigeni vivi e inattivati dal β -propiolattone. Sperimentale 108, 391 (1958)

58. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., and RANDALL, R.J. — Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265 (1951)

59. MATTERN, C.F.L. and DuBUY, H.G. — Purification and crystallization of coxsackievirus. Science 123, 1037 (1956)

60. MAYER, M.M. — Diskussionsbemerkung. Spec.Public.N.Y.Acad.Sci. (1957)

61. MAYER, M.M. and RAPP, H.J. — Complement fixation with purified poliovirus. Fed.Proc. 15, 603 (1956)

62. MAYER, M.M., RAPP, H. J., ROIZMAN, B., KLEIN, S.W., COWAN, K.M., LUKENS, D., SCHWERDT, C.E., SCHAFFER, F.L., and CHARNEY, J. — The purification of poliomyelitis virus as studied by complement fixation. J. Immunol. 78, 435 (1957)

63. MAYOR, H.D. — Picornavirus symmetry. Virology 22, 156 (1964)

64. MELNICK, J.L. — Isolation of virus and the development of neutralizing and complement fixing antibodies in poliomyelitis patients. N.Y. Acad. Sci. 61, 1005 (1955)

65. MELNICK, J.L. — Echo viruses. N.Y.Acad.Sci. 5, 365 (1957)

66. MELNICK, J.L. — Enteroviruses: A review of their history and present status. Israel J.Med.Sci. 1, 272 (1965)

67. MELNICK, J.L., RAMOS-ALWAREZ, M., BLACK, F. L., GIARDI, A.J., and NAGAKI, D. — Poliomyelitis viruses in tissue culture VII. Experience with viral and serological diagnostic procedure. Yale J.Biol.Med. 26, 465 (1954)

68. MELNICK, J.L., ASHKENAZI, A., and BERNSTEIN, A. — Immunogenic potency of $MgCl_2$-stabilized oral poliovaccine. J.Am.med.Ass. 185, 406 (1963)

69. MUNCH, B.S. — Complement fixation employed for typing of coxsackie A viruses isolated from patients. Acta Path.Microbiol.Scand. 58, 471 (1963)

70. NEVA, F.A. — A second outbreak of Boston exanthem in Pittsburgh during 1954. New Engl.J.Med. 254, 838 (1956)

71. NEVA, F.A. and MALONE, M.F. — Specific and cross reactions by complement fixation with Boston exanthem disease virus (Echo 16). J. Immunol. 83, 645 (1959)

72. NUNEZ-MONTEIL, O., WEIBEL, J., and VITELLI-FLORES, J.
Electron microscopic study of the cytopathology of Echo virus infection in cultivated cells
J.biophys.biochem.Cytol. 11, 457 (1961)

73. OSLER, A.G., STRAUSS, J.Y., and MAYER, M.M.
Diagnostic complement fixation I. A method
Amer.J.Syph.Gonor.and Ven.Dis. 36, 140 (1952)

74. PANEL FOR PICORNA-VIRUSES
Picornaviruses: Classification of nine new types
Science 141, 153 (1963)

75. POLSON, A. and HAMPTON, J.W.
Studies on poliomyelitis virus. Concentration and purification of the virus
Amer.J.Hyg. 55, 344 (1957)

76. POLTZIN, E.A., SCHMIDT, W.A.K. und WIGAND, R.
Die Komplementbindungsreaktion mit Coxsackie- und Echo-Virusantigenen in Vorbereitung

77. RAMOZ-ALVAREZ, M. and SABIN, A.B.
Role of enteropathogenic viruses and bacteria in summer diarrheal diseases of infancy and early childhood
J.Am.Med.Ass. 167, 147 (1958)

78. RANZENHOFER, E.R., DIZON, F.C., LIPTON, M.M., and STEIGMAN, A.J.
Clinical paralytic poliomyelitis due to Coxsackie virus group A, type 7
New Engl.Med.J. 259, 182 (1958)

79. REISSIG, M., HOWER, O.W., and MELNICK, J.L.
Sequence of morphological changes in epithelial cell cultures infected with poliovirus
J.exp.Med. 104, 289 (1956)

80. RIFKIND, R.A. GOLDMANN, G.C., HOWE, C., MORGAN, C., and ROSE, H.M.
Echo 9 virus in tissue culture observed by light and electron microscopy
Virology 12, 331 (1960)

81. ROBBA, L., and VIRAT, J.
Preparation d'antigènes pour la déviation du complément le diagnostic serologique des affections à virus Coxsackie groupe B
Ann.Inst.Past. 99, 784 (1960)

82. ROBBINS, F.C., ENDERS, J.F., WELLER, T.H., and FLORENTINE, G.L.
Studies on the cultivation of poliomyelitis viruses in tissue culture V. The direct isolation and serological identification of virus strains in tissue culture from patients with nonparalytic and paralytic poliomyelitis
Amer.J.Hyg. 54, 286 (1951)

83. ROIZMAN, B., MAYER, M.M., and RAPP, H.J. — Fractionation and alteration of complement fixing poliovirus antigens Fed.Proc. 16, 431 (1957)

84. ROIZMAN, B., MAYER, M.M., and RAPP, H.J. — Immunochemical studies of poliovirus III. Further studies on the immunological and physical properties of poliovirus particles produced in tissue culture J.Immunol. 81, 419 (1958)

85. ROIZMAN, B., MAYER, M., and ROAN, P.jr. — Immunochemical studies of poliovirus IV. Alteration of the immunological specifity of purified poliomyelitis virus by heat and ultraviolet light J.Immunol. 82, 19 (1959)

86. SABIN, A.B. — Reoviruses, a new group of respiratory and enteric viruses formely classified as Echo virus type 10 is described Science 130, 1387 (1959)

87. SCHAFFER, F.L. and SCHWERDT, C.E. — Purification and properties of poliovirus Adv.Virus Res. 6, 159 (1959)

88. SCHMIDT, N.J. and LENNETTE, E.H. — A complement fixation test for poliomyelitis J.exp.Med. 102, 133 (1955)

89. SCHMIDT, N.J. and LENNETTE, E.H. — Modification of the homotypic specifity of poliomyelitis complement fixing antigens by heat J.exp.Med. 104, 99 (1956)

90. SCHMIDT, N.J., LENNETTE, E.H., DOLEMAN, J.H., and HAGENS, S.J. — Factors influencing the potency of poliomyelitis complement fixing antigens produced in tissue culture systems Am.J.Hyg. 66, 1 (1957)

91. SCHMIDT, N.J. and LENNETTE, E.H. — A microflocculation test for poliomyelitis: With observations on the flocculation antibody response in human poliomyelitis Am.J.Hyg. 70, 51 (1959)

92. SCHMIDT, N.J., LENNETTE, E.H., HAGENS, S.J., and — The behaviour of different strains of poliomyelitis virus in the complement fixation reaction II. The sensitivity and specific of antigens derived from various strains J.Immunol. 84, 160 (1960)

93. SCHMIDT, N.J., DENNIS, J., HAGENS, S.J., and LENNETTE, E.H. — Studies on the antibody responses of patients infected with Echo viruses Am.J.Hyg. 75, 168 (1962)

94. SCHMIDT, N.J., DENNIS, D., and LENNETTE, E.H. — Complement fixing antibody responses to Echo virus types 12 and 19 of patients with enterovirus infections Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 109, 364 (1962)

95. SCHMIDT, N.J., DENNIS, J., FROMMHAGEN, L.H., and LENNETTE, E.H. — Serological reactivity of certain antigens obtained by fractionation of Coxsackieviruses in cesium chloride density gradients J.Immunol. 90, 654 (1963)

96. SCHMIDT, W.A.K., — Untersuchungen zur KBR der Poliomyelitis II. Die serologische Beschaffenheit verschiedener Typ-III-Antigene. Arch.ges.Virusforsch. 12, 17 (1962)

97. SCHMIDT, W.A.K. — Zwei neue Methoden zur Konzentrierung und Reinigung von Polioviren Arch.ges.Virusforsch. 12, 455 (1962)

98. SCHMIDT, W.A.K. — Einige Bemerkungen zur Herstellung von Polio-Hyperimmunseren Zbl.Bakt.I.Orig. 189, 538 (1963)

99. SCHMIDT, W.A.K. — Neue Methoden zur Konzentrierung und Reinigung von Polio-Antigen Zbl.Bakt.I.Orig. 191, 130 (1963)

100. SCHMIDT, W.A.K. — Untersuchungen zur KBR der Poliomyelitis IV Arch.ges.Virusforsch. 13, 358 (1963)

101. SCHMIDT, W.A.K. — Verhalten der Polio-Antigene im Ecteola-Zellulose-Ionenaustauscher Arch.ges.Virusforsch. 13, 368 (1963)

102. SCHMIDT, W.A.K. — Untersuchungen über die fraktionierte Fällbarkeit der Polio-Antigenbestandteile mit Polyphosphorsäure Arch.ges.Virusforsch. 14, 508 (1964)

103. SCHMIDT, W.A.K. — Die Antigen-Komponenten des Poliovirus in der Komplementbindungsreaktion Ann.Univ.Sarav. 14, 68 (1967)

104. SCHMIDT, W.A.K., HÖPKEN, W., und WOHLRAB, R. — Untersuchungen zur Komplementbindungs-Reaktion der Poliomyelitis I. Verwendung konzentrierter und fraktionierter Antigene Arch.ges.Virusforsch. 10, 617 (1960)

105. SCHMIDT, W.A.K., PITTLER, H., und HÖPKEN, W. — Über die Fällbarkeit von Enteroviren mit Polyphosphorsäure. Z.Naturforsch. 20 b, 402 (1965)

106. SCHWERDT, C.E. — Physical and chemical characteristics of purified poliomyelitis virus. N.Y.Acad.Sci. 5, 157 (1957)

107. SCHWERDT, C.E. and SCHAFFER, F.L. — Purification of poliomyelitis viruses propagated in tissue culture. Virology 2, 665 (1956)

108. SHAVER, D.N., BARRON, A.L., and KARZON, D.T. — Distinctive cytopathology of Echo viruses types 22 and 23. Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 106, 648 (1961)

109. SMOLENS, J., GREENE, A., and CORRIEL, L. — Concentration and purification of polio viruses. Science 122, 240 (1955)

110. STUART, D.C.jr. and FOGH, J. — Electron microscopic demonstration of intracellular poliovirus crystals. Exp.Cell Res. 18, 378 (1959)

111. SVEDMYR, A., ENDERS, J.F., and HOLLOWAY,A. — Complement fixation with Brunhilde and Lansing poliomyelitis viruses propagated in tissue culture. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 79, 296 (1952)

112. SVEDMYR, A., ENDERS, J.F., and HOLLOWAY,A. — Complement fixation with three types of poliomyelitis viruses propagated in tissue culture. Am.J.Hyg. 57, 60 (1953)

113. UNDERWOOD, G.E., WISNER, C.A., WEED, S.D., and GRAY, J.E. — Coe virus: growth characteristics in Hela cells and in mice. Amer.J.Hyg. 76, 124 (1962)

114. VINCENT, P., et BÊTAIL, G. — Purification partielle d'une suspension de virus poliomyelitique en vue de l'obtention d'un antigène pour réaction de fixation du complément. Compt.rend.Soc.Biol. 158, 2147 (1964)

115. VIVELL, O. und LIPS, G. — Komplementbindungsreaktion mit dem Echo-Virus Typ 9 (Coxsackie-Virus Typ A 23). 2.Hyg.Infekt.-Kr. 145, 131 (1958)

116. VOROSHILOVA, M.K. and CHUMAKOV, M.P. — Poliomyelitis like properties of AB-IV-Coxsackie A 7 group of viruses. Progr.med.Virol. 2, 106 (1959)

117. WALLIS, C., MELNICK, J.L., and BIANCHI, M. Factors influencing enterovirus and reovirus growth and plaque formation Tex.Rep.Biol.Med. 20, 693 (1962)

118. WARREN, J., WEIL, M.L., RUSS, S.B., and JEFFRIES, H. Purification of certain viruses by use of protamin zinc sulfat Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 72, 662 (1949)

119. WENNER, H.A. Problems with enteroviruses Ann.N.Y.Acad.Sci. 101, 343 (1962)

120. WENNER, H.A. and BEHBEHANI, A.M. Preparation and standardization of Coxsackie reference antisera II. For six group B viruses Amer.J.Epidem. 82, 27 (1965)

121. WIGAND, R. Erfahrungen mit der Mikromethode der Komplementbindungsreaktion 2.Hyg. 143, 188 (1956)

122. WIGAND, R. and SABIN, A.B. Intratypic antigenic heterogenity of Coxsackie B viruses 12, 29 (1962)

123. WITT, G. und BRUNOTTE, E. Vergleichende Versuche zur Reinigung und Konzentration von Virussuspensionen Arch.f.Hyg.Bakt. 148, 536 (1964)

124. ZEIPEL, G. and SVEDMYR, A. A study of the association of Echo viruses to aseptic meningitis Arch.ges.Virusforsch. 7, 355 (1957)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. Wigand und Herrn Privatdozent Dr. W.A.K. Schmidt danke ich für die Überlassung des Themas und die Hilfe bei der Planung und Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr.Dr. W. Zimmermann bin ich für die Gewährung eines Arbeitsplatzes verpflichtet.

Lebenslauf

Helmut * A b e l

668 Neunkirchen
Hospitalstraße 40

Als Sohn der Eheleute Josef Abel, Müllermeister, und Maria Abel, geb. Lehmann wurde ich am 23. Dezember 1942 in Merzig (Saar) geboren.

Von 1948 bis 1952 besuchte ich die Volksschule in Brotdorf (Saar). Anschließend besuchte ich das Staatliche Realgymnasium in Merzig bis zur Reifeprüfung im Jahr 1961.

Mein Medizinstudium begann ich in Saarbrücken, setzte es dann in Freiburg (Breisgau) und anschließend in Homburg (Saar) bis zum Physikum fort. Im Sommer 1967 legte ich hier die Ärztliche Prüfung ab. Von September bis einschließlich Dezember des gleichen Jahres war ich als Medizinalassistent an der Universitäts-Frauenklinik in Homburg (Saar) tätig. Anfang 1968 setzte ich meine Ausbildung im Knappschaftskrankenhaus in Neunkirchen (Saar) fort, wo ich zur Zeit meine Interne Pflichtzeit ableiste.

Helmut A b e l

ROTAPRINT-
OFFSET-
DRUCKEREI

Klein

6602 DUDWEILER Scheidter Straße 26
Tel. Sulzbach 7 32 84

IHR LIEFERANT FÜR DRUCKSACHEN ALLER ART